



Caractérisation des facteurs de régulation de la prolifération des cellules souches neurales dans le cerveau adulte

Mathieu Daynac

► To cite this version:

Mathieu Daynac. Caractérisation des facteurs de régulation de la prolifération des cellules souches neurales dans le cerveau adulte. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA112204 . tel-00968161

HAL Id: tel-00968161

<https://theses.hal.science/tel-00968161>

Submitted on 31 Mar 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS SUD

Ecole doctorale : Gènes génomes cellules (GGC)

DOCTORAT de
BIOLOGIE CELLULAIRE

par

Mathieu DAYNAC

**CARACTERISATION DES FACTEURS DE REGULATION DE LA
PROLIFERATION DES CELLULES SOUCHES NEURALES DANS LE
CERVEAU ADULTE**

Thèse dirigée par Dr. Marc-André MOUTHON

Soutenue publiquement le 30 septembre 2013

JURY

Dr. Martial RUAT	Président du Jury
Dr. Françoise LAZARINI	Rapporteur
Dr. Laurent NGUYEN	Rapporteur
Dr. Pierre FOUCHET	Examineur
Dr. François BOUSSIN	Examineur
Dr. Marc-André MOUTHON	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les membres du jury
De leurs yeux avisés sur ce long manuscrit
Et sans oser prétendre, de cet art vous instruire
J'espère que ce projet a pu vous divertir

Ave O toi César, Manitou des méninges
Qui a su égayer ce groupe de vieux singes
J'implore le grand Cèdre, que jamais tu ne rouilles!
Car toujours te revoir, ne sera que good nouille !

A son fidèle bras droit, qui a su m'aiguiller
Dans ces chemins nerveux, au péril de sa vie ...
Que cette belle escalade atteigne des sommets
Pour partager nos vœux, autour d'un bon méchoui !

Comment te remercier, O ma grande soeur Lucille
Toi ma none au grand coeur, Princesse de pacotille
Ton humour acéré a rythmé mes journées
Halas Mathieu Aire, proverbe libanais !

Au roi de la brocante, le plus grand homme moderne
Sans qui mes soirs d'été auraient-été bien ternes
Apprécie ta choucroute avec quelques patates
Au plaisir des pesées, Jack do you copy that ?

Et le clou du spectacle, danse avec des bananes
Elle brave les grands froids, en la nomme Chan Chan
Elle a bien la main verte, malgré ses tendinites
Et ce fut un plaisir, d'écouter ses critiques :)

A chiche "A chiche A chiche ! Aie Aie Aie ! A chiche Aie !
Des débuts difficiles, mais un plaisir de taille !
A la reine des lombrics, au roi des ouvrières
Que la lumière soit dans votre humble tanière !

Rosé jambon pinède, gracias a tu cabron !
Que buena tortilla, me gusto el turon !
Aux oiseaux de passage, Hayet en djellaba
L'amant dine et ils naissent, boussinettes de choix

Big up aux trois wesh wesh, les filles d'à coté
Que je ne nommerai, par peur de représailles
Hystéries collectives, animations sans failles
Dallas au rez-de-chaussée, ne fut que pure gayté !

Et que de pauses café, faites avec toi Josy !
Moments inoubliables, qui me manquent déjà ...
Sans oublier cloclo, moulin sans foi ni loi
Gachette de la tchatte, parade a tout ennui !

A vous amis thésards, compagnons de galère
Qui avez su porter la croix et la bannière
Loulou lebeau kortu, pour votre humour grivois
Et à ceux que j'oublie dans ces vers à la noix !

Enfin à mes amis, qui se reconnaîtront
Et gloire au clan daynac, mon amour ma passion !
Micha ton bleu qui tache, et lilou ma nânja
A mes soeurs adorées, je tire mon chapeau bas

MERCI §

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	3
AVANT-PROPOS.....	10
<i>Découverte de la neurogenèse dans le cerveau adulte</i>	<i>10</i>
INTRODUCTION	13
1. DEVELOPPEMENT DU CERVEAU	13
1.1 La neurogenèse embryonnaire.....	13
1.1.1 Structure du cortex en développement.....	13
1.1.2 Neurogenèse embryonnaire et formation du cortex cérébral.....	13
1.1.3 La neurogenèse continue après la naissance	15
2. LA NEUROGENESE DANS LE CERVEAU ADULTE.....	17
2.1 Zones de neurogenèse dans le cerveau adulte	17
2.1.1 La neurogenèse dans la zone sous-grulaire de l'hippocampe.....	17
2.1.2 La neurogenèse dans la zone sous-ventriculaire	20
2.1.3 Autres sites de neurogenèse dans le cerveau adulte mammifère.	24
2.2 Caractérisation des cellules souches neurales	27
2.2.1 Mise en évidence des CSN adultes et de leurs cellules filles	27
2.2.2 Organisation de la niche neurogénique dans la ZSV.....	29
2.2.3 Marqueurs caractéristiques des CSN adultes.....	31
2.2.4 Purification des CSN adultes et des cellules filles dans la ZSV	33
3. MODIFICATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES DE LA NEUROGENESE ADULTE	37
3.1 Stimulation par l'enrichissement, l'exercice ou la gestation	37
3.2 Reprise de la neurogenèse après ischémie cérébrale	38
3.3 Rayonnements ionisants et neurogenèse	40
3.3.1 Irradiation du système nerveux central.....	40
3.3.2 Les effets cellulaires des rayonnements ionisants.....	40
3.3.3 Effets de l'irradiation sur la ZSV et la ZSG	41
3.3.4 Modèles d'irradiation des zones neurogéniques.....	42
3.4 Vieillesse des niches neurogéniques.....	44
3.4.1 Chez la souris.....	44
3.4.2 Chez l'humain.....	45
4. REGULATION MOLECULAIRE DE LA NEUROGENESE ADULTE	47
4.1 Régulation de la prolifération cellulaire dans les phases précoces de la neurogenèse adulte	47
4.1.1 Facteurs de croissance EGF, FGF-2, VEGF et IGF	47
4.1.2 La voie Sonic Hedgehog (Shh).....	49
4.1.3 La voie Notch.....	49
4.1.4 La voie de signalisation Wnt/ β caténine	50
4.1.5 La superfamille des TGF β	51

4.1.6 Ephrines	51
4.1.7 Neurotransmetteurs	51
4.2 Régulation de la balance quiescence/activation des CSN adultes	56
4.2.1 Quiescence et activation des cellules souches.....	56
4.2.3 Régulateurs du cycle cellulaire des CSNs.....	57
4.2.4 Modulateurs intrinsèques d'auto-renouvellement des CSN.....	58
4.2.5 Signaux de la niche régulant la balance quiescence/activation des CSN.....	59
4.4 Mécanismes et facteurs associés au vieillissement des niches neurogéniques.....	64
4.4.1 EGF et FGF2	64
4.4.2 Télomérase.....	64
4.4.3 Modifications du cycle cellulaire des CSN au cours du vieillissement	65
OBJECTIFS.....	67
RESULTATS	69
ARTICLE 1 :	69
<i>Identification of factors involved in neurogenesis recovery after irradiation of the adult mouse subventricular zone: a preliminary study.</i>	<i>69</i>
ARTICLE 2 :	93
<i>Quiescent neural stem cells exit dormancy upon alteration of GABAAR signaling following radiation damage</i>	<i>93</i>
ARTICLE 3 :	125
<i>Vascular-derived TGF-β increases in the stem cell niche and perturbs neurogenesis during aging and following irradiation in the adult mouse brain</i>	<i>125</i>
ARTICLE 4 :	163
<i>TGF-β lengthens G1 phase of stem cells in aged brain</i>	<i>163</i>
FIGURE LEGENDS.....	197
FIGURE SUP LEGENDS	199
DISCUSSION	201
1. PURIFICATION DES CSN DE LA ZSV PAR CYTOMETRIE EN FLUX	201
1.1 Difficultés à purifier les CSN des niches neurogéniques	201
1.2 Stratégie permettant de purifier les CSN quiescentes, les CSN activées ainsi que leurs cellules filles	202
2. MODELE D'IRRADIATION DU CERVEAU A DOSE MODEREE.....	204
2.1 Régénération de la ZSV après une dose modérée d'irradiation.....	204
2.2 Entrée en cycle des CSN quiescentes après irradiation	204
3. ROLE DU NEUROTRANSMETTEUR GABA DANS LE MAINTIEN DE LA QUIESCENCE DES CSN.	206
3.1 Influence négative du GABA sur la prolifération des CSN <i>in vivo</i>	206
3.2 La voie de signalisation GABA _A R régule le statut de quiescence des CSN.....	206
4. PERTURBATION DU CYCLE CELLULAIRE DES CSN AU COURS DU VIEILLISSEMENT.	209
4.1 Le vieillissement n'altère pas le stock de CSN jusqu'aux adultes d'âge moyen mais perturbe leur prolifération.....	209

4.2 L'allongement de la phase G1 des CSN activées est impliqué dans la réduction de la neurogenèse au cours du vieillissement.....	209
5. LE TGFB1 EST UN FACTEUR MAJEUR DE VIEILLISSEMENT DES CSN DANS LA ZSV.....	211
5.1 Allongement de la G1 par la voie TGFβ/Smad3	211
5.2 Le blocage pharmacologique de la voie TGFβ/Smad3 rétablit la neurogenèse dans les niches de souris âgées	211
CONCLUSION.....	213
TABLE DES ILLUSTRATIONS	217
LISTE DES ABBREVIATIONS	218
BIBLIOGRAPHIE	219
RESUME	238

AVANT-PROPOS

Découverte de la neurogenèse dans le cerveau adulte

Pendant une grande partie du XX^{ème} siècle, un dogme central en neurobiologie stipulait que la neurogenèse n'avait lieu qu'au stade embryonnaire et que le cerveau adulte était statique et ne subissait aucun renouvellement cellulaire. Selon Ramon y Cajal, « une fois le développement terminé, la croissance et la régénération des axones et des dendrites s'arrête irrévocablement. Chez l'adulte, les réseaux nerveux sont fixes et immuables. Tout est destiné à mourir, rien ne peut être régénéré » (Ramon y Cajal 1913-1914). Cependant, les premières évidences d'une activité mitotique dans le cerveau adulte mammifère émanent des travaux d'Allen, dès 1912. Ils mettent en évidence la présence de formes mitotiques dans le cerveau adulte de rats albinos {Allen, E. J. Comp. Neurol. 22, 547-568 (1912)}. Pour Allen, la zone bordant les ventricules latéraux du cerveau adulte présente un intérêt particulier car on y retrouve des cellules en division et des mitoses même chez les spécimens âgés, et la couche de cellules bordant le ventricule semble persister, même chez les rats âgés de 2 ans. Cependant, Allen n'a pu prouver que cette activité mitotique permettait de produire des neurones et des cellules gliales, une question qui restera irrésolue jusqu'aux travaux de Joseph Altman dans les années 1960. L'introduction de nouvelles techniques autoradiographiques après l'administration de précurseurs à ADN comme la thymidine tritiée [³H] a permis de mettre en évidence en 1958 la présence de synthèse d'ADN et de mitoses dans le cerveau de jeunes souris adultes (Messier et al., 1958). Ces cellules se situent au niveau de la couche épendymaire bordant les ventricules latéraux. Puis Altman mettra en évidence en 1962, en traçant par autoradiographie les cellules incorporant la thymidine tritiée [³H], la formation de nouveaux neurones après des lésions de type électrolytiques dans le cerveau de jeunes rats adultes (Altman, 1962). Son équipe caractérisera un an plus tard une deuxième région présentant des cellules en prolifération dans le cerveau adulte du rat ; au niveau du gyrus denté de l'hippocampe (Altman, 1963), puis découvrira peu après que les cellules peuplant la zone sous-ventriculaire ont la capacité de migrer jusqu'aux bulbes olfactifs le long d'un chemin de migration cellulaire bien défini, appelé RMS pour Rostral Migratory Stream, avant de se différencier en neurones

(Altman and Das, 1965, Altman, 1969). Il faudra attendre 1992 pour observer une nouvelle avancée majeure dans le domaine de la neurogenèse adulte chez les mammifères. L'équipe de Samuel Weiss découvre, en isolant les cellules de la zone sous-ventriculaire, que certaines cellules sont capables de proliférer *in vitro* en réponse à l'EGF (facteur de croissance de l'épiderme), puis de se différencier en astrocytes et neurones, supposant l'existence de cellules souches neurales (Reynolds and Weiss, 1992). Des expériences utilisant la Bromodeoxyuridine (ou BrdU), analogue de la thymidine s'incorporant en phase S du cycle cellulaire, ont permis de confirmer la présence de prolifération cellulaire au bord des ventricules latéraux ainsi qu'un RMS jusqu'aux bulbes olfactifs (Lois and Alvarez-Buylla, 1993) (Lois and Alvarez-Buylla, 1994). Le concept de cellules souches neurales adultes sera pleinement accepté après les travaux de Morshead en 1994, qui montrent que la déplétion des cellules en prolifération par des agents anti-mitotiques entraîne l'entrée en prolifération de cellules souches qui permettent de repeupler rapidement la zone sous-ventriculaire. Ces travaux supposent qu'un stock de cellules souches neurales reste présent dans un état de « quasi-quiescence » et permettent une neurogenèse continue à l'âge adulte chez les mammifères (Morshead et al., 1994). Les CSN adultes donnent naissance aux oligodendrocytes, astrocytes ainsi qu'aux neuroblastes migrants et destinés à se différencier en interneurones dans les bulbes olfactifs ou en neurones granulaires dans l'hippocampe.

Jusqu'à présent, les cellules souches et précurseurs neuronaux du cerveau adulte ont été isolées avec succès chez les rongeurs, primates, moutons, cochons, chats et chiens (Reynolds and Weiss, 1992) (Pagano et al., 2000) (Wang et al., 2007) (Duittoz and Hevor, 2001) (Milward et al., 1997). Nous nous intéresserons plus particulièrement dans ce travail de thèse à la caractérisation de la neurogenèse dans le cerveau adulte murin mais les études *in vitro* et *in vivo* des CSN de toutes ces espèces animales ont révélées une remarquable conservation des mécanismes neurogéniques entre les espèces (Curtis et al., 2007) (Doetsch et al., 1997) (Gil-Perotin et al., 2009) (Liu and Martin, 2003) (Rodriguez-Perez et al., 2003) (Weissman et al., 2003). Ainsi, les primates non-humains, les animaux domestiques et plus particulièrement les rongeurs où la connaissance de la biologie des cellules souches neurales est la plus aboutie sont des modèles de valeur pour la compréhension de la

neurogenèse humaine et sont largement utilisés pour les recherches et les études thérapeutiques sur les maladies neurologiques humaines.

INTRODUCTION

1. DEVELOPPEMENT DU CERVEAU

1.1 La neurogenèse embryonnaire

1.1.1 Structure du cortex en développement

Chez tous les mammifères, des régions peuplées de cellules en prolifération au bord du ventricule produisent des neurones migrants vers la surface des vésicules cérébrales, à l'extrémité du tube neural, en formant le néocortex (Sidman and Rakic, 1973) (Marin and Rubenstein, 2003). Cette structure est la portion la plus récente de l'évolution du cortex cérébral. Après une première phase d'expansion, le néocortex en développement, puis le néocortex adulte présentent une structure en couches superposées. Les types cellulaires peuplant le néocortex ainsi que son organisation en six couches ont été décrites avec précision dès les travaux de Ramon y Cajal à la fin du XIXème siècle {Cajal S.R. (1894) *Proceedings of the Royal Society of London*, **55**: 444-468 } (Figure 1). Cependant, les noms des différentes couches corticales embryonnaires ont été uniformisés en 1970 lors du Comité Boulder (1970)

1.1.2 Neurogenèse embryonnaire et formation du cortex cérébral

Lors des premiers stades de sa formation, le cortex cérébral est initialement formé de cellules neuroépithéliales (NE), aussi appelées cellules souches, issues de l'épithélium neuroectodermal présent avant la formation du tube neural. Ces cellules forment l'épithélium germinal qui sera appelé zone ventriculaire (ZV) lors du comité Boulder. Avant la mise en place de la neurogenèse, les cellules en prolifération présentes dans la ZV forment un épithélium homogène pseudostratifié et se divisent symétriquement (Rakic, 1988). Leurs noyaux migrent jusqu'au bord du ventricule peu avant la métaphase et vers les couches extérieures durant la synthèse d'ADN, dans un processus appelé la migration nucléaire intercinétique {Sauer F.C J. *Comp. Neurol.* **62**, 377-405 (1935)} (Caviness and Rakic, 1978).

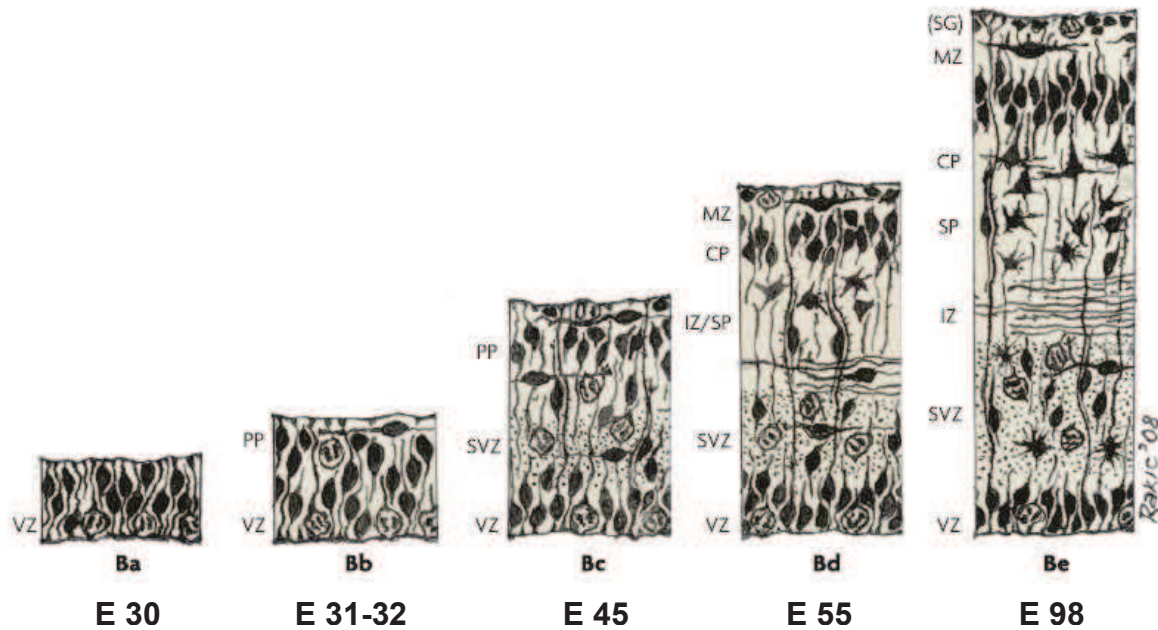


Figure 1 : Version révisée par Bystron et al. (Bystron et al., 2008) du modèle de développement néocortical humain proposé lors du comité Boulder en 1970.

Cette prolifération intensive augmente rapidement la surface et l'épaisseur de la ZV. Le début du processus de formation de neurones fonctionnels, appelé neurogenèse, se produit vers E33 (33 jours post-conception) chez l'homme (Bystron et al., 2006) et E10 chez la souris (Garcia-Moreno et al., 2007). A ce stade, les cellules souches neuroépithéliales passent d'un mode de division symétrique à un mode de division asymétrique (Chenn and McConnell, 1995). Ainsi, une des cellules filles engendrées reste progénitrice tandis que l'autre est destinée à devenir un neurone ou une cellule gliale (Noctor et al., 2001). Peu à peu, des cellules en division vont apparaître sur la couche basale de la ZV (Smart, 1973) et créer la zone sous-ventriculaire (ZSV) embryonnaire. Les progéniteurs présents dans la ZSV produisent des cellules gliales ainsi qu'une grande partie des neurones des couches corticales chez la souris, le singe ou l'homme (Zecevic et al., 2005). Les neurones formés dans l'une ou l'autre de ces zones migrent à travers la zone intermédiaire (ZI) pour aller rejoindre la plaque corticale, leur destination finale. Ils vont former successivement les six couches du cortex adulte de la plus ancienne, la couche VI, à la plus externe, dernière formée, la couche I (Sidman and Rakic, 1973).

1.1.3 La neurogenèse continue après la naissance.

Quelques jours après la naissance, la glie radiaire disparaît en se différenciant en astrocytes et cellules épendymaires (Spassky et al., 2005). La couche de cellules épendymaires devient la nouvelle ZV, et les astrocytes issus des cellules de la glie radiaire se situent en dessous de cette couche dans la zone sous-ventriculaire (figure 2). Il existe donc un continuum qui lie les cellules souches NE aux cellules de la glie radiaire puis finalement aux cellules souches neurales (CSN) dans le cerveau adulte (Doetsch et al., 1999a). Les régions latérales et ventrales de la zone sous-ventriculaire (ZSV) du cerveau adulte, produisant les précurseurs neuronaux des bulbes olfactifs (BO), proviennent respectivement des éminences ganglionnaires latérales (LGE) et des éminences ganglionnaires médianes (MGE), régions proliférative du télencéphale en développement (Hinds, 1968) (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009) (Figure 3). Les cellules souches neurales de l'autre principale zone de neurogenèse du cerveau adulte, au niveau de l'hippocampe, seraient issue du neuroepithelium adjacent à l'ourlet cortical durant le développement embryonnaire de l'hippocampe (Altman and Bayer, 1990, Li and Pleasure, 2005). Ces CSN se relocaliseraient de la partie ventrale de l'hippocampe en fin de gestation à la partie dorsale de l'hippocampe à l'âge adulte, dans la zone sous-granulaire (ZSG) (Li et al., 2013).

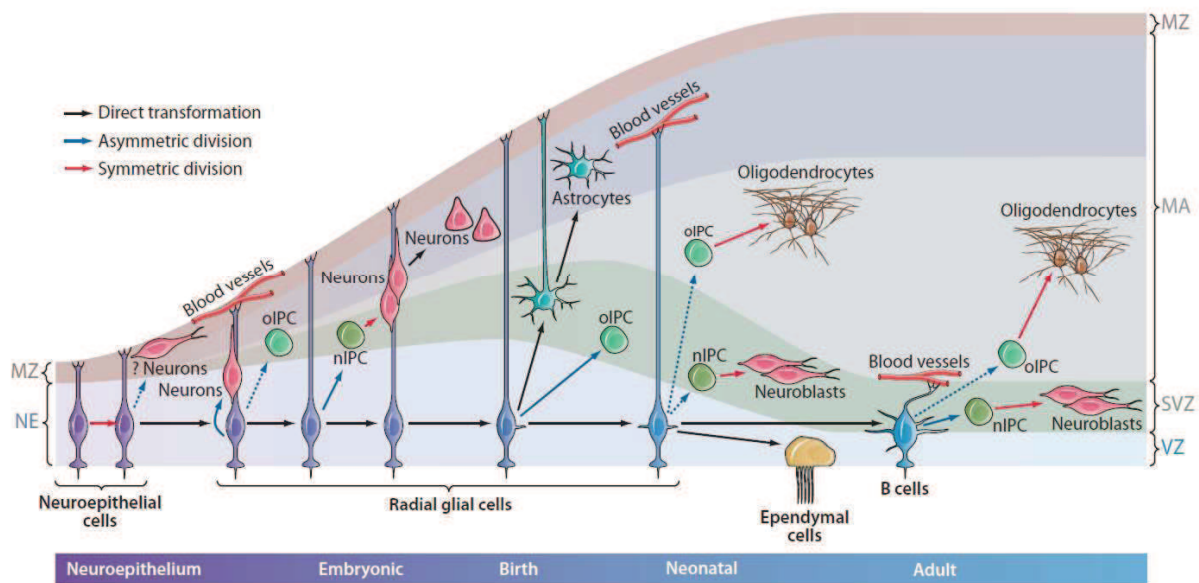


Figure 2 : Neurogenèse au cours du développement du cerveau

Evolution et localisation des cellules souches neurales (en bleu) de l'embryon à l'adulte (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009)

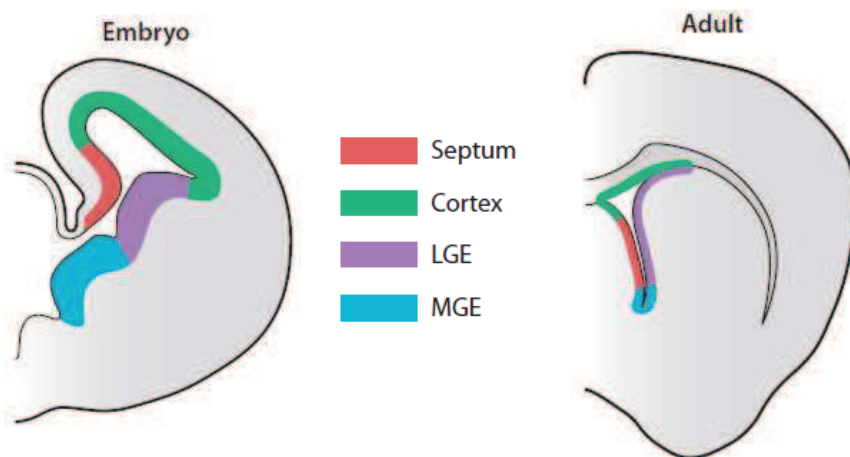


Figure 3 : Origine des cellules des zones sous-ventriculaires du cerveau adulte

Les cellules bordant les ventricules à l'âge adulte sont issues de 4 régions prolifératives embryonnaires : le septum, le cortex, les éminences ganglionnaires latérales (LGE) et les éminences ganglionnaires médianes (MGE) (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009)

2. LA NEUROGENESE DANS LE CERVEAU ADULTE

2.1 Zones de neurogenèse dans le cerveau adulte

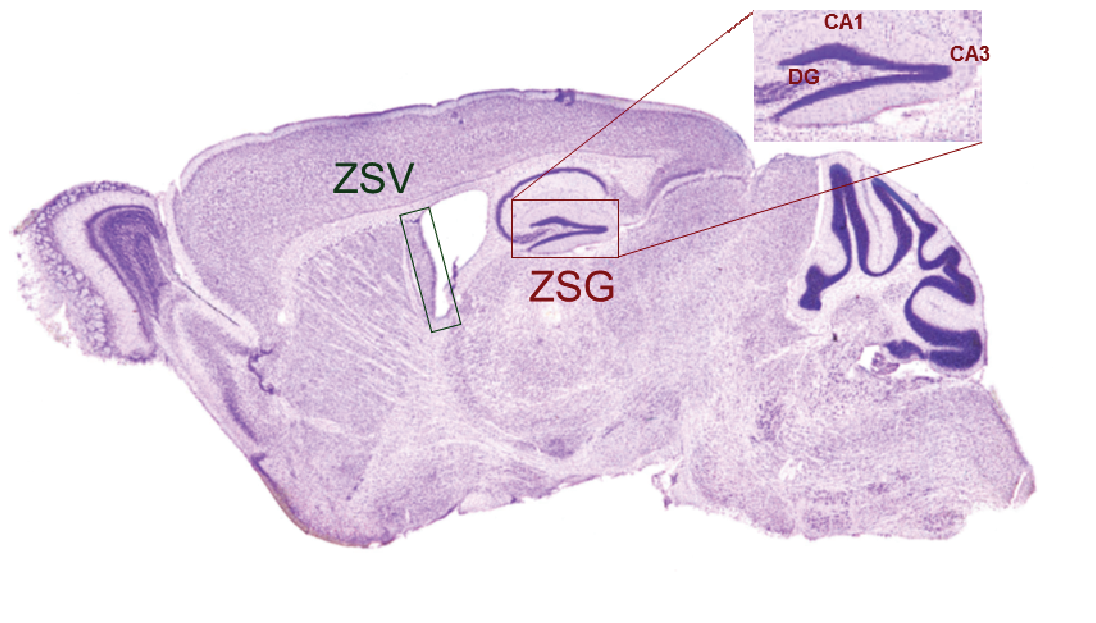


Figure 4 : Principales zones de neurogenèse dans le cerveau adulte murin

Coupe sagittale de cerveau de jeune souris adulte (2 mois) présentant la zone sous-granulaire (ZSG) du gyrus denté de l'hippocampe et la zone sous-ventriculaire (ZSV).

2.1.1 La neurogenèse dans la zone sous-granulaire de l'hippocampe

L'hippocampe est une structure primordiale pour la formation de la mémoire, comme la mémoire épisodique ou la mémoire spatiale (Squire, 1992). A travers ses interactions avec des structures cérébrales liées à l'émotion, l'hippocampe pourrait aussi être intimement lié au comportement émotionnel (Sahay and Hen, 2008). La neurogenèse adulte dans l'hippocampe est initiée par la prolifération de précurseurs neuronaux au niveau de la zone sous-granulaire (ZSG) (Figure 4). La grande majorité de ces précurseurs vont se différencier en neurones granulaires de l'hippocampe, tandis qu'une population moins abondante se différencie en cellules gliales (Cameron et al., 1993). Les précurseurs neuronaux (ou neuroblastes) produits vont ensuite entamer un long processus de maturation morphologique avant de

devenir des neurones matures (Figure 5). Il faut noter que la cinétique de maturation des neurones granulaires varie entre les espèces (Snyder et al., 2009). Nous décrivons ici la cinétique de maturation des neurones granulaires chez la souris car elle est la plus complète et la plus documentée. La première semaine suivant leur formation, les jeunes neuroblastes granulaires initient leur processus de différenciation et migrent sur une courte distance le long de la couche intérieure de cellules granulaires du gyrus denté, où ils développent leurs prolongements cellulaires mais ne semblent pas encore intégrés dans les synapses du réseau neuronal existant (Esposito et al., 2005). Deux semaines après leur apparition, les neuroblastes commencent à acquérir des caractéristiques de neurones matures ; ils développent dendrites et axones à travers le hilus du gyrus denté et une zone appelée *Cornu Ammonis 3* (CA3) (Zhao et al., 2006) (Hastings et al., 2002) (figure 4). Quatorze à 21 jours après leur apparition, les jeunes neuroblastes commencent à former des connections afférentes et efférentes avec le réseau neuronal local. Au seizième jour suivant leur formation, des épines dendritiques commencent à apparaître, formant des synapses avec les fibres d'axones afférents venant du cortex entorhinal, centre de la mémoire dans le cerveau (Zhao et al., 2006) (Toni et al., 2007). Entre 4 et 6 semaines, les neuroblastes continuent progressivement leur maturation physiologique ainsi que le développement de leur connectivité, et présentent même à ce stade une plasticité synaptique plus importante que les neurones granulaires matures. Cette plasticité synaptique permet une grande capacité d'adaptation des circuits neuronaux nouvellement formés, ainsi que le maintien de la stabilité du circuit neuronal mature (Ge et al., 2007). Bien que des modifications structurelles des épines dendritiques et des boutons terminaux des axones continuent à apparaître au fur et à mesure de la maturation des neuroblastes (Toni et al., 2007), les propriétés physiologiques ainsi que la plasticité synaptique des neuroblastes à 8 semaines est similaire à celles des neurones granulaires. De nombreuses études réalisées ces dernières années montrent que l'intégration de ces neuroblastes dans les circuits neuronaux de l'hippocampe adulte pourrait avoir des contributions importantes dans l'apprentissage et la mémoire (recensées dans (Deng et al., 2010)). Bien qu'il ait été observé une grande conservation des phénotypes et mécanismes neurogéniques entre les espèces (Curtis et al., 2007), il est toujours difficile de corréliser ces études faites chez la souris à l'humain. La neurogenèse dans l'hippocampe humain a été démontrée (Eriksson et al., 1998) et elle est altérée par

de nombreuses maladies neurologiques comme la dépression, l'épilepsie, la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson, qui sont pour la plupart associées à un déclin des capacités cognitives (Zhao et al., 2008). Récemment, des techniques d'imagerie non invasives ont permis l'étude de la neurogenèse dans le cerveau humain (Manganas et al., 2007) (Pereira et al., 2007). Ces nouvelles techniques pourraient permettre d'évaluer le fonctionnement de la neurogenèse chez l'humain et dans des conditions physiopathologiques variées, et ainsi permettre l'amélioration des thérapies pour ces maladies neurologiques pour lesquelles les modèles animaux restent inadaptés.

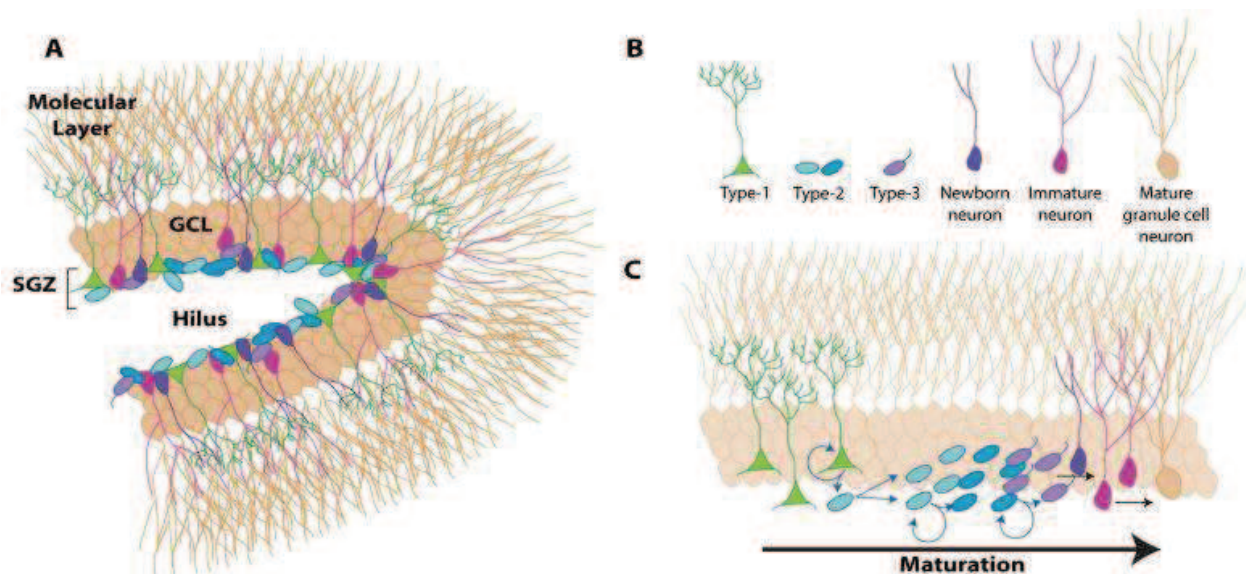


Figure 5 : Neurogenèse dans l'hippocampe adulte

(A) La zone sous-granulaire se situe entre le hilus et la couche de cellules granulaires (GCL). La ZSG contient différentes cellules à des stades distincts de différenciation représentée en (B) et dont les étapes de maturation sont schématisées en (C) (Eisch et al., 2008)

2.1.2 La neurogenèse dans la zone sous-ventriculaire

a) Neurogenèse au niveau de la ZSV

Le système olfactif des mammifères est un excellent modèle pour étudier le développement des circuits neuronaux. Il guide de nombreux comportements, comme l'alimentation, le comportement social et la reproduction. De plus, le système olfactif présente la particularité de remodeler en permanence ses circuits olfactifs car des neurones sont ajoutés et remplacés tout au long de la vie (Lledo et al., 2006). Cette neurogenèse est initiée dans la zone sous-ventriculaire qui s'étend le long des ventricules latéraux dans le cerveau adulte (Figure 4). Dans la ZSV, des cellules de type astrocytaire exprimant la GFAP (glial fibrillary acidic protein), ont une fonction de cellules souches neurales (CSN) (Doetsch et al., 1999a). Cette caractéristique inclue le cerveau humain, où des astrocytes de la SVZ ayant des capacités de cellules souches ont été identifiées *in vitro* (Sanai et al., 2004) (Leonard et al., 2009) (van den Berge et al., 2010). Les CSN adultes se divisent lentement et donnent naissance aux progéniteurs nerveux, qui se divisent rapidement. Ces derniers se différencient en neuroblastes (Lois and Alvarez-Buylla, 1994), qui expriment les marqueurs de cellules en migration comme la doublecortine (DCX) et PSA-NCAM.

b) Migration vers les bulbes olfactifs

Après leur formation dans la ZSV, les neuroblastes s'organisent en amas de cellules et migrent dans une gaine de cellules astrocytaires (Lois and Alvarez-Buylla, 1994), le long d'un chemin de migration rostrale (RMS pour rostral migratory stream) (Figure 6A). Chez l'humain, la gaine de cellules astrocytaires n'a pas été mise en évidence (Sanai et al., 2004). Bien caractérisée chez le rongeur, la migration des neuroblastes le long des ventricules peut prendre différentes directions, mais dans le RMS ils migrent regroupés en chaîne dans une gaine d'astrocytes et 80% d'entre eux migrent de façon rostrale (i.e vers le rostrum, latin pour « bec ») jusqu'aux bulbes olfactifs (BO) (Bolteus and Bordey, 2004). La migration dans le RMS n'est pas uniforme et les cellules peuvent s'arrêter et même changer de direction (Nam et al., 2007). L'orientation et la migration des neuroblastes dans le RMS pourraient dépendre du flux de liquide céphalo-rachidien induit par le battement des cils des cellules de

l'épendyme, des cellules épithéliales organisées en monocouches qui bordent les ventricules. En effet, dans les souris présentant des cils motiles défectueux, les neuroblastes ne peuvent pas migrer correctement dans RMS, prouvant que la circulation normale du liquide céphalo-rachidien est nécessaire à la bonne orientation des neuroblastes avant leur migration jusqu'aux bulbes olfactifs (Sawamoto et al., 2006). De plus, il a été prouvé récemment que les chaînes migratoires de neuroblastes sont intimement associées aux vaisseaux sanguins qui sont supposés servir de soutien pour la migration (Snapyan et al., 2009). Une fois qu'ils ont atteint le bulbe olfactif, les neuroblastes se détachent de la chaîne de migration et migrent de façon radiaire afin de s'intégrer aux réseaux neuronaux existants de la zone corticale (Lois and Alvarez-Buylla, 1993). La migration des neuroblastes est similaire chez les singes nouveaux nés et adultes (Gil-Perotin et al., 2009) (Pencea et al., 2001a).

Chez l'homme, deux études ont démontré la présence d'un RMS dans le cerveau fœtal humain (Weickert et al., 2000) (Guerrero-Cazares et al., 2011). Cependant, l'existence d'un RMS dans le cerveau adulte humain reste controversée. En effet, on retrouve des cellules en prolifération dans la ZSV du cerveau adulte humain, ainsi que des neurones immatures migrant dans une structure assimilée au RMS (Sanai et al., 2004) (Curtis et al., 2007). Ces articles ont cependant été remis en question par une autre équipe qui clame que l'existence d'une chaîne de migration des neurones immatures dans le cerveau adulte humain n'est pas clairement établie (Sanai et al., 2007). Cette même équipe a ensuite prouvé que le cerveau des nouveaux nés humain contient effectivement un large couloir de migration des neurones immatures jusqu'à 18 mois, mais que la neurogenèse diminue sensiblement durant l'enfance pour devenir quasi inexistante à l'âge adulte (Sanai et al., 2011). Enfin, une publication récente semble confirmer l'existence d'un RMS dans le cerveau simien et humain adulte (Wang et al., 2011). Cependant, si les neuroblastes sont présents dans la partie antérieure ventrale de la ZSV et dans le RMS, ils ne semblent pas atteindre les bulbes olfactifs (Wang et al., 2011).

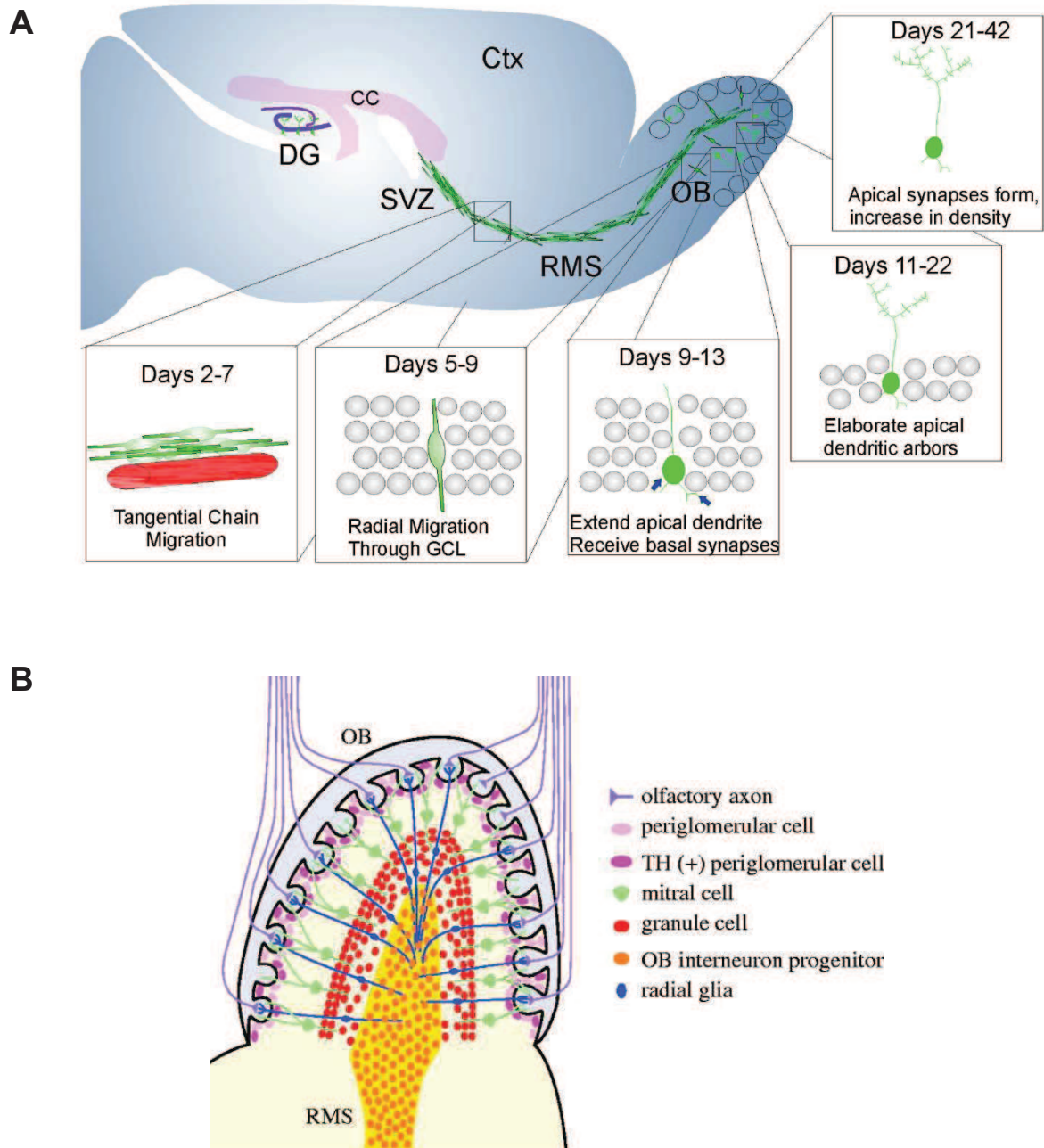


Figure 6 : Neurogenèse de la zone sous-ventriculaire vers les bulbes olfactifs

(A) Schéma de migration des neuroblastes dans le cerveau adulte murin, et des étapes de maturation des interneurones du bulbe olfactif. Les neuroblastes formés dans la ZSV migrent le long du RMS en chaîne. Dans le bulbe olfactif, les neuroblastes migrent de façon radiaire dans la couche de cellules granulaires et la couche glomérulaire et se différencient en cellules granulaires et cellules périglomérulaires. *DG*, gyrus denté; *CC*, corps calleux ; *Ctx*, Cortex ; *ZSV*, Zone sous-ventriculaire ; *RMS*, chemin de migration rostrale ; *OB*, Bulbe olfactif. (Whitman and Greer, 2009) (B) Organisation cellulaire du bulbe olfactif murin (Yoshihara et al., 2005).

c) Différenciation des neuroblastes en cellules granulaires

Au fur et à mesure de leur intégration dans les réseaux neuronaux du bulbe olfactif, les neuroblastes se différencient progressivement en cellules granulaires et interneurones périglomérulaires. Petreanu et Alvarez-Buylla définissent 5 étapes de différenciation des neuroblastes en cellules granulaires chez la souris (Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002) (figure 6A). En utilisant un marquage rétroviral permettant de cibler les précurseurs dans la ZSV, ils ont prouvé que les cellules migrent tangentiellement à travers le RMS jusqu'aux bulbes olfactifs entre 2 et 7 jours après infection. Les neuroblastes migrants ont une morphologie simple, avec un long corps et de courts prolongements. Puis les neuroblastes (jours 5-7) migrent de façon radiaire à travers la couche de cellules granulaires du bulbe olfactif, en gardant la même morphologie. Les cellules semblent avoir stoppé leur migration et atteint leur position finale dans la couche de cellules granulaires 9 à 13 jours après infection, Elles ont un simple prolongement dendritique se dirigeant vers la couche de cellules mitrales sans la traverser (figure 6 A,B). A la 4^{ème} étape de différenciation, les cellules granulaires fraîchement formées étendent leurs dendrites mais ne développent pas encore d'épines dendritiques, tandis qu'elles atteignent à l'étape 5 leur morphologie finale, avec des épines dendritiques fonctionnelles. Entre 15 et 45 jours après leur formation, environ 50% des cellules granulaires nouvellement formées meurent ; les autres peuvent survivre jusqu'à un an chez les rongeurs (Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002) (Winner et al., 2002). L'apprentissage de nouvelles odeurs influence à la fois la survie et l'intégration des nouveaux neurones (Alonso et al., 2006) (Mouret et al., 2008).

d) Intégration synaptique

Une des interrogations principales concernant la neurogenèse adulte était de savoir si les nouveaux neurones formés pouvaient s'intégrer dans le réseau synaptique préexistant, et si oui, s'ils altéraient les fonctions cérébrales préexistantes. Il existe plusieurs preuves de l'intégration synaptique des neurones formés à l'âge adulte. Les nouvelles cellules granulaires présentant des morphologies de neurones matures possèdent un potentiel synaptique, incluant des courants glutamatergiques (Carleton et al., 2003). Quant aux neuroblastes, à tout âge de leur maturation, ils

expriment des récepteurs pour l'acide γ -aminobutyrique (GABA), mais qui pourrait correspondre à un signal GABA extrasynaptique (Carleton et al., 2003) (Bolteus and Bordey, 2004). En utilisant des marqueurs synaptiques et la microscopie électronique, il a été prouvé que l'intégration synaptique des cellules granulaires se déroule durant deux étapes de différenciation chez la souris : 10 jours après leur naissance dans la ZSV où les premières connections se forment, et vers 21 jours, avec la formation de connections dendro-dendritiques dans la couche externe du bulbe olfactif (Whitman and Greer, 2007) (figure 6B). La formation rapide de connections synaptiques permet aux nouveaux neurones de recevoir des informations du réseau neuronal existant avant d'y contribuer. Ainsi, les nouveaux neurones s'intégrant aux circuits fonctionnels « écoutent avant de parler » (Kelsch et al., 2008). Il n'y a pas de preuve d'intégration synaptique des neuroblastes formés dans la ZSV du cerveau adulte humain, qui semblent migrer au plus loin jusqu'au tractus olfactif, mais ne pas atteindre le bulbe olfactif (Wang et al., 2011). Cependant, ces études sont encore controversées et les auteurs n'excluent pas la possibilité que les jeunes neuroblastes du cerveau adulte humain expriment des marqueurs différents et encore non caractérisés à leur arrivée dans le bulbe olfactif (Wang et al., 2011).

2.1.3 Autres sites de neurogenèse dans le cerveau adulte mammifère.

Il est important de noter que la neurogenèse ne semble pas se limiter exclusivement à la ZSV et la ZSG, même si elles sont les zones principales de formation de nouveaux neurones dans le cerveau adulte. La production de nouveaux neurones a été décrite dans le néocortex, les bulbes olfactifs, le cortex piriforme, le striatum, la substance noire et l'hypothalamus (Migaud et al., 2010). Il existe toujours des controverses sur l'existence d'une neurogenèse dans ces zones considérées à priori non-neurogéniques. En effet, certaines études n'ont été capable de détecter la génération de nouveaux neurones seulement après stress ou manipulation pharmacologiques (Emsley et al., 2005). C'est le cas de l'hypothalamus, structure responsable du contrôle de nombreuses fonctions neuroendocrines comme la reproduction ou l'homéostasie. La prolifération cellulaire et la production de nouveaux neurones ont été prouvées dans l'hypothalamus de nombreuses espèces à l'âge adulte, bien que non encore démontrées chez l'humain et les primates non-

humains (Huang et al., 1998) (Pencea et al., 2001b) (Kokoeva et al., 2005) (Matsuzaki et al., 2009). Quelques études supposent l'existence de CSN dans l'hypothalamus au bord du troisième ventricule cérébral qui seraient capables de produire des neurones tout au long de la vie (Migaud et al., 2010). Les plus importantes découvertes sur ces nouvelles zones de neurogenèse dans le cerveau adulte sont recensées dans le tableau 1. Cependant, il reste à prouver que ces nouvelles zones de neurogenèse sont peuplées de CSN que l'on peut caractériser *in vivo*, et si oui, si elles partagent les propriétés des CSN de la ZSV ou de la ZSG. Il reste aussi à prouver l'implication fonctionnelle de ces nouveaux sites de neurogenèse dans le cerveau adulte et leur existence et leur fonctionnalité dans le cerveau humain.

Structures cérébrales	Méthode	Espèces	Références
Néocortex	[³ H]-thymidine	Rat, chat	Altman, 1963
	BrdU	Rat, hamster, primate	Dayer <i>et al.</i> , 2005 Gould <i>et al.</i> , 1999,2001 Bernier <i>et al.</i> , 2002 Huang <i>et al.</i> , 1998 Fowler <i>et al.</i> , 2002
Bulbes olfactifs	Ki67-PCNA	Humain	Bedard & Parent, 2004
	BrdU	Rat, souris	Liu & Martin, 2003 So <i>et al.</i> , 2008 Fukushima <i>et al.</i> , 2002
Striatum	BrdU	Rat, lapin, primate	Dayer <i>et al.</i> , 2005 Pencea <i>et al.</i> , 2001 Luzzati <i>et al.</i> , 2006 Bedard <i>et al.</i> , 2002
Corne de ammon de l'hippocampe	BrdU	Souris	Rietze <i>et al.</i> , 2000
Cortex piriforme	BrdU	Rat, primate	Pekcec <i>et al.</i> , 2006 Bernier <i>et al.</i> , 2002
Amygdale	BrdU	Primate, campagnol	Fowler <i>et al.</i> , 2002 Bernier <i>et al.</i> , 2002
Substance noire	[³ H]-thymidine et BrdU	Souris	Zhao <i>et al.</i> , 2003
Complexe dorsal vagal du tronc cérébral	BrdU	Rat	Bauer <i>et al.</i> , 2005
Hypothalamus	BrdU	Souris, rat hamster, campagnol	Kokoeva <i>et al.</i> , 2005 Kokoeva <i>et al.</i> , 2007 Xu <i>et al.</i> , 2005 Perez-Martin <i>et al.</i> , 2010 Matsuzaki <i>et al.</i> , 2009 Huang <i>et al.</i> , 1998 Pencea <i>et al.</i> , 2001 Fowler <i>et al.</i> , 2002 Migaud <i>et al.</i> , 2009 Pierce & Xu, 2010

Tableau 1 : Autres zones de neurogenèse dans le cerveau adulte

D'autres zones de neurogenèse que la ZSV et la ZSG semblent exister dans le cerveau adulte, même si leur existence reste controversée.

2.2 Caractérisation des cellules souches neurales

2.2.1 Mise en évidence des CSN adultes et de leurs cellules filles

L'analyse de l'ultrastructure de la ZSV chez la souris adulte a montré l'existence de cellules qui présentaient des propriétés d'astrocytes : expression de la protéine acide fibrillaire gliale GFAP (filament intermédiaire présent sur les astrocytes) du transporteur de glutamate GLAST (permettant notamment de réguler la concentration extracellulaire en glutamate) ainsi que d'autres marqueurs astrogliaux (Doetsch et al., 1997, Platel et al., 2008a). Ces cellules, appelées cellules de type B, peuplent la ZSV avec des progéniteurs immatures en prolifération ou cellules de type C et de neuroblastes en migration, nommées cellules de type A (Doetsch et al., 1997) (figure 7A). Le traitement par la drogue anti-mitotique cytosine D-β-arabino-furososide (Ara-C) ou la [³H]-thymidine détruit les cellules en prolifération et les chaînes de neuroblastes. Quelques jours après l'arrêt du traitement, on observe une reprise de la neurogenèse (Morshead et al., 1994) (Doetsch et al., 1999a). Les cellules de type B deviennent plus abondantes après traitement et sont responsables de la régénération de la ZSV. Puis il a été observé une réapparition progressive des cellules de type C et enfin des cellules de type A (Doetsch et al., 1999a). La caractérisation de la recolonisation des zones neurogéniques a permis d'établir la filiation entre les trois différentes populations de cellules dans la ZSV (type B → type C → type A) (Doetsch et al., 1999a) (Figure 7A). Une autre classification a été créée pour distinguer les cellules de la ZSG : les progéniteurs intermédiaires correspondent aux cellules de type D ; les neuroblastes aux cellules de type G, (Seri et al., 2001) (Figure 7B). D'autres approches ont permis de confirmer que la GFAP est un marqueur des CSN. Il restait en effet envisageable que les cellules GFAP ne soient pas à l'origine de la reprise de la neurogenèse mais qu'elles agissent comme un support neurotrophique nécessaire à la neurogenèse. L'utilisation de souris transgéniques exprimant la thymidine kinase sous le contrôle du promoteur de la GFAP et le traitement de ces souris par le ganciclovir conduit à la destruction des cellules de type B et abolit la neurogenèse dans la ZSV et de la ZSG (Morshead et al., 2003) (Garcia et al., 2004) prouvant que les cellules GFAP sont indispensables à la neurogenèse. De plus, le traçage génétique a permis de mettre en évidence que

les cellules de type C et de type A dérivent des cellules exprimant la GFAP (Garcia et al., 2004). Dans la ZSG, les CSN ont la même nature astrocytaire que les cellules souches bordant le ventricule avec l'expression de la GFAP (Seri et al., 2001). Ces travaux démontrent formellement que les cellules de type B GFAP⁺ sont les CSN à l'origine de la neurogenèse dans le cerveau adulte.

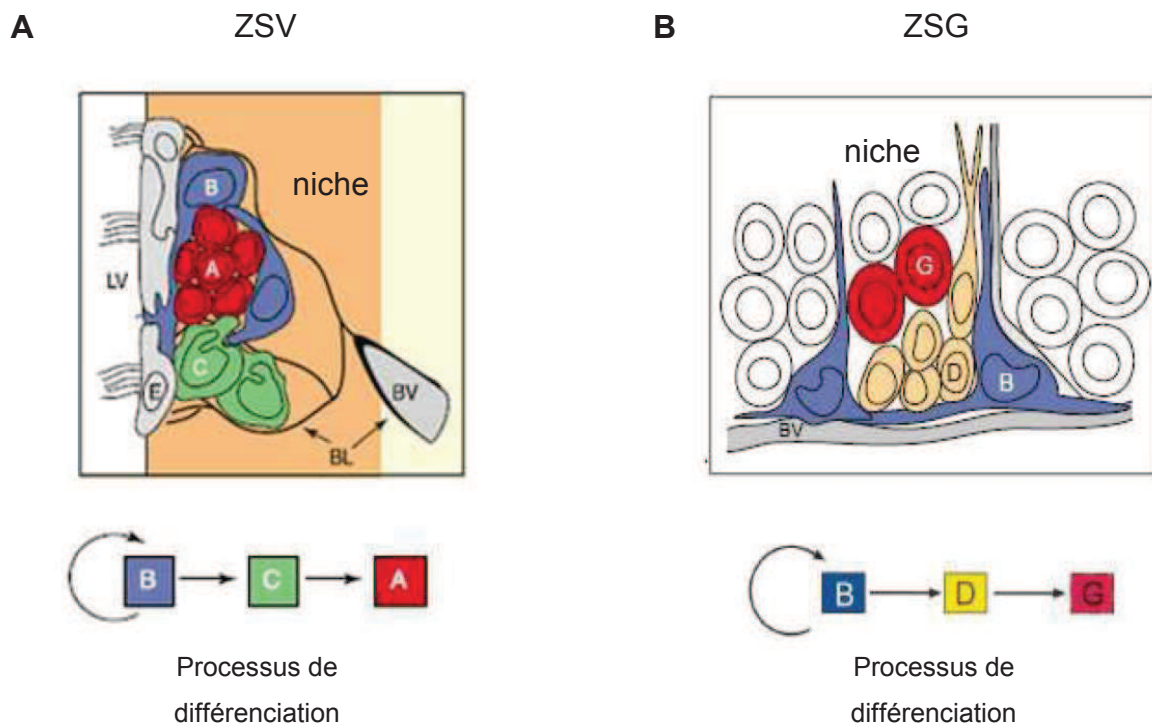


Figure 7 : Composition cellulaire des niches neurogéniques dans la ZSV et la ZSG

(A) La ZSV borde le ventricule latéral (LV), elle est séparée du ventricule par une couche de cellules ependymaires (E). Les CSN (B) entourent les neuroblastes néoformés (A) et les progéniteurs intermédiaires de type C. Les cellules de type B sont enchâssées dans la couche basale (BL) à proximité des micro-vaisseaux (BV). (B) Au niveau du Gyrus Denté de l'hippocampe, la niche des CSN de l'hippocampe contient les cellules souches (B) qui sont en contact avec la lame basale des micro-vaisseaux (BV), les progéniteurs intermédiaires (D) et les neuroblastes néoformés (G). Adapté de (Doetsch, 2003)

2.2.2 Organisation de la niche neurogénique dans la ZSV

Des études récentes prouvent que les cellules de type B gardent des propriétés de la glie radiaire (cellules souches embryonnaires). Elles sont intercalées dans la couche de cellules épendymaires bordant le ventricule latéral, avec une terminaison apicale contactant le ventricule (Mirzadeh et al., 2008, Tavazoie et al., 2008) (Shen et al., 2008). Les CSN et leurs cellules filles du cerveau adulte murin sont regroupées dans un microenvironnement particulièrement spécialisé appelé niche neurogénique (figure 7). L'équipe d'Arturo Alvarez-Buylla a proposé récemment un modèle permettant une meilleure compréhension de l'organisation complexe de la niche neurogénique dans la ZSV (Fuentelba et al., 2012). Notons qu'ils ont appelé ici les CSN cellules de type B1 pour la ZSV par opposition aux autres astrocytes non souches peuplant la ZSV et baptisées B2. Dans ce modèle, il est proposé par de compartimenter l'environnement des cellules souches de type B1 en trois domaines : domaine proximal ou apical (I), domaine intermédiaire (II) et domaine distal ou basal (III) (figure 8). Le domaine proximal des cellules de type B1 est en contact direct avec le ventricule. Ce contact avec le ventricule peut être observé par des préparations en « whole mount » (vue en face) de la zone sous-ventriculaire. Les CSN expriment un cil primaire contactant le ventricule (Mirzadeh et al., 2008). Cette caractéristique les différencie des cellules épendymaires, qui ont une grande surface apicale présentant au moins 50 cils motiles au liquide céphalo-rachidien circulant dans les ventricules (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009). Un nouveau type de cellules épendymaires (E2) semblent contenir seulement deux longs cils (Mirzadeh et al., 2008) mais la fonction de ces cellules reste inconnue. Sur la surface ventriculaire, les cellules de type B1 sont entourées de cellules épendymaires, dans une organisation unique baptisée « *pinwheel architecture* » que nous traduirons ici par « *architecture alvéolaire* » (Mirzadeh et al., 2008). Les cellules épendymaires aident au maintien de la structure et permettent l'orientation du flux de liquide céphalo-rachidien avec leurs multiples cils motiles (Sawamoto et al., 2006). Les cellules de type B1 avec leur petite surface apicale, sont en contact direct avec le liquide céphalo-rachidien, qui contient des facteurs solubles qui pourraient améliorer la croissance et la survie des progéniteurs neuronaux (Lehtinen and Walsh, 2011).

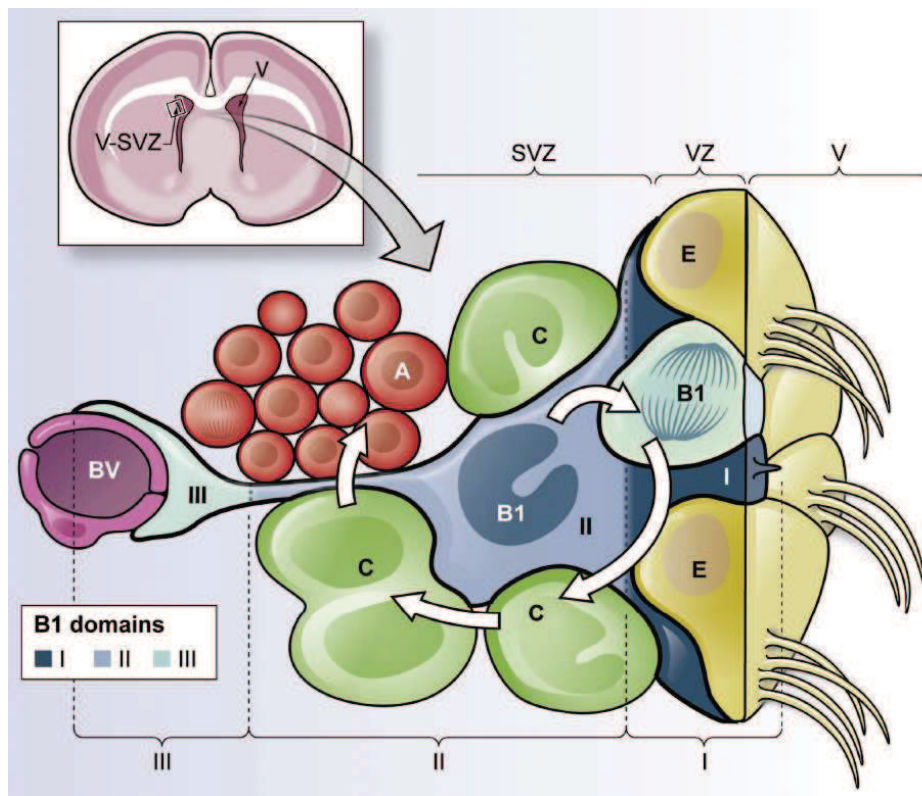


Figure 8 : Schéma des 3 différents domaines des cellules de type B dans la ZSV murine adulte

Les CSN sont les cellules de type B1 (en bleu). Elles sont entourées par des cellules épendymaires multiciliées (E), formant des structures alvéolaires ou « pinwheel » sur la surface ventriculaire. Les cellules de type B1 se différencient en progéniteurs nerveux, ou cellules de type C (en vert) qui se divisent et se différencient pour donner naissance aux neuroblastes (cellules de type A en rouge). Les CSN ont des propriétés de cellules épithéliales, avec une surface apicale contactant le ventricule (V) et présentant un cil primaire et un long prolongement basal se terminant sur les vaisseaux sanguins (BV en violet). (Fuentelba et al., 2012)

Le maintien de la neurogenèse tout au long de la vie adulte nécessite le contrôle de la prolifération des CSN. En effet, il a été proposé que des mécanismes de rétrocontrôle pourraient exister et informer les CSN du nombre de nouveaux neurones déjà formés. Dans leur domaine intermédiaire, les cellules de type B1 sont en contact avec les progéniteurs et les neuroblastes, permettant certainement un rétrocontrôle direct des cellules différenciées via des signaux vers les CSN (Liu et al., 2005) (Kawaguchi et al., 2013). Les vaisseaux sanguins de la ZSV étendent leur matrice extracellulaire jusqu'au contact des cellules de type B1 et C (Mercier et al., 2002). Dans leur domaine basal (III) les cellules de type B1 sont intimement associées aux vaisseaux sanguins en contactant directement les cellules endothéliales (Shen et al., 2008) (Tavazoie et al., 2008). Des clusters de cellules B1 et C en division sont associés aux vaisseaux sanguins aux endroits où la barrière hémato-encéphalique paraît plus poreuse (Tavazoie et al., 2008). Des facteurs sanguins pourraient directement avoir accès aux CSN et progéniteurs et réguler leur prolifération, cet aspect sera détaillé plus loin.

Dans la ZSV du primate, l'organisation structurale est un peu différente de celle décrite chez le rongeur. Chez l'homme, même si les CSN humaines expriment la GFAP (Kukekov et al., 1999) (Sanai et al., 2004), elles sont séparées de la couche de cellules ependymaires par un espace, ou « gap », absent de la ZSV des rongeurs, ce qui suppose une organisation différente de la niche qui reste à caractériser (Sanai et al., 2004).

2.2.3 Marqueurs caractéristiques des CSN adultes

Il n'existe pas encore à ce jour de marqueur moléculaire spécifique des cellules de type B1. Trouver un marqueur spécifique qui permettrait de distinguer les CSN des autres astrocytes peuplant les zones neurogéniques reste un des défis principaux dans le domaine de la neurogenèse adulte. Nous décrivons plus spécifiquement les marqueurs caractérisant les CSN présentes dans la zone sous-ventriculaire qui font l'objet de mon travail de thèse. Bien que les cellules de type B1 de la ZSV, comme les cellules de la glie radiaire embryonnaires, expriment la Nestin et Sox2, elles expriment aussi la GFAP, le transporteur au glutamate GLAST ainsi que la BLBP

(brain lipid binding protein) (Doetsch et al., 1999a, Liu et al., 2006). Mais tous ces marqueurs communément utilisés pour distinguer les CSN dans les zones neurogéniques adultes sont aussi des marqueurs de cellules astrocytaires et ne permettent donc pas de distinguer les cellules de type B1 des astrocytes non souches. Le S100 β , marqueur de cellules gliales, a été utilisé pour distinguer les astrocytes matures des CSN dans la ZSV (Raponi et al., 2007). Le S100 β est un marqueur d'astrocytes matures, mais n'est pas un marqueur de CSN puisqu'il n'est pas exprimé par les cellules de type B1 dans la ZSV (Raponi et al., 2007). Nous avons vu que les CSN sont partiellement imbriquées dans la couche de cellules épendymaires et qu'elles possèdent un cil primaire (Mirzadeh et al., 2008). Cependant, les marqueurs ciliaires comme la prominin 1 (ou CD133 chez l'humain) (Pinto et al., 2008) (Weigmann et al., 1997) sont également exprimés sur les cellules épendymaires et ne permettent pas une identification exclusive des CSN. Un des récent candidats prometteur est le récepteur nucléaire *tailless* (Tlx) qui est exprimé dans les cellules de type B1 et semble être essentiel au bon déroulement de la neurogenèse adulte (Liu et al., 2008). Cependant, il a été récemment prouvé que Tlx est aussi exprimé dans les cellules de type C de la ZSV (Li et al., 2012). Un autre candidat est l'inhibiteur de fixation à l'ADN 1 (Id1), un inhibiteur des facteurs de transcription de type bHLH. Une forte expression d'Id1 identifie une rare population d'astrocytes GFAP⁺ avec des propriétés de cellules de type B le long des ventricules latéraux du cerveau adulte murin. Les cellules Id1^{high} sont relativement quiescentes, se divisent asymétriquement et peuvent générer des cellules de type B1 ainsi que des cellules différenciées exprimant des niveaux de plus en plus faibles d'Id1 (Nam and Benezra, 2009). Les cellules exprimant fortement Id1 dans la ZSV pourraient donc correspondre aux CSN. De plus les protéines Id semblent coordonner et favoriser l'ancrage des CSN à leur niche. En effet, l'inactivation conditionnelle des 3 gènes Id (Id1, Id2 et Id3) dans les CSN entraîne le détachement des CSN embryonnaires et postnatales de la niche ventriculaire et vasculaire, respectivement (Niola et al., 2012). Cependant, l'expression d'Id1 n'est pas exclusive aux CSN, seul un gradient d'expression permet de distinguer les cellules souches des cellules différenciées. De plus une forte expression d'Id1 est aussi associée aux cellules endothéliales, présentes dans les niches neurogéniques de la ZSV (Ciarrocchi et al., 2007). Parmi les découvertes les prometteuses concernant les marqueurs de cellules B1, le Lewis X (LeX/CD15) est un carbohydrate extracellulaire présent sur les

cellules souches embryonnaires pluripotentes et également enrichi dans une sous-population de cellules de la ZSV exprimant la GFAP (Capela and Temple, 2002). Le LeX a été utilisé pour enrichir la population de cellules de la ZSV pouvant former des colonies *in vitro* et est considéré comme un marqueur potentiel des CSN. De plus LeX semble être plus spécifique des zones neurogéniques qu'un marqueur astrocytaire comme la GFAP puisque les astrocytes non neurogéniques du cortex adulte ne l'expriment pas (Imura et al., 2006). L'intérêt du LeX par rapport au Tlx ou à l'Id1 est que c'est un récepteur membranaire, il pourrait permettre une meilleure purification des CSN. Des études récentes s'intéressent à la structure des carbohydrates pour produire des anticorps anti-LeX encore plus spécifiques des CSN (Hennen et al., 2011).

Dans le cerveau adulte humain, bien que la neurogenèse soit quasi-inexistante et controversée, cela n'exclut pas la présence de cellules souches quiescentes, dont les marqueurs caractéristiques restent à déterminer (Curtis et al., 2007, Sanai et al., 2007, Sanai et al., 2011). Quelques-unes de ces cellules pourraient fonctionner comme des cellules souches *in vitro*. Une analyse transcriptionnelle a montré que les astrocytes périventriculaires humains possèdent des marqueurs distincts des astrocytes parenchymaux (Oldham et al., 2008), et pourrait conduire à une meilleure appréhension des astrocytes aux propriétés souches chez l'homme adulte.

2.2.4 Purification des CSN adultes et des cellules filles dans la ZSV

Plusieurs études ont utilisé ces marqueurs de CSN ou une combinaison de marqueurs pour purifier les populations de la ZSV par cytométrie en flux (FACS pour fluorescence-activated cell sorting). La plupart des équipes ont caractérisé les populations enrichies en CSN par leur capacité à former des neurosphères *in vitro*. La technique de culture en neurosphères évalue la capacité des cellules, cultivées en milieu liquide sans adhérence et en présence de facteurs de croissances, à former des amas de cellules de forme sphérique i.e neurosphères (prolifération) qui peuvent survivre après plusieurs passages (autorenouvellement) et qui peuvent se différencier en astrocytes, oligodendrocytes ou neurones (multipotence) (Reynolds and Weiss, 1992). Une étude pionnière a purifié les CSN par cytométrie en flux et montré que la population Nestin⁺PNA^{low}HSA^{low} dans la ZSV regroupe 63% des

cellules capables de former des neurosphères *in vitro* et a la capacité de se différencier en neurones (Rietze et al., 2001). L'équipe de Kawaguchi a ensuite généré des souris transgéniques, qui expriment la GFP sous le promoteur de la Nestin, permettant une distinction facile des cellules exprimant la Nestin par cytométrie en flux. En triant les cellules Nestin-GFP(+), ils sont parvenus à isoler les populations capables de former des neurosphères, sans toutefois pouvoir corrélérer l'expression de la Nestin à la quantité de neurosphères formées (Kawaguchi et al., 2001). La capacité des CSN de la ZSV à proliférer *in vitro* en présence d'EGF a ensuite été exploitée en triant les cellules EGFR^{high} vs EGFR^{low}, pour prouver que les cellules exprimant fortement l'EGFR rassemblaient une grande majorité des cellules formant des neurosphères *in vitro*, sans pouvoir distinguer les CSN en prolifération des cellules de type C (Ciccolini et al., 2005). Plus récemment, Pastrana et coll. ont réussi à distinguer les cellules de type B1 en prolifération des cellules de type C en utilisant des souris transgéniques GFAP-GFP pour marquer les astrocytes ainsi qu'un ligand fluorescent de l'EGFR pour marquer les cellules exprimant le récepteur à l'EGF (Pastrana et al., 2009). Cette technique exploite le fait que les cellules de type B1 et C n'expriment pas le CD24 et commencent à l'acquérir au stade de cellule de type A (Rietze et al., 2001). Cela a permis de purifier par cytométrie en flux les cellules de type B1 en prolifération [GFAP-GFP(+)EGFR(+)CD24(-)], les cellules de type C [GFAP-GFP(-)EGFR(+)CD24(-)] ainsi que les cellule de type A [GFAP-GFP(-)EGFR(-)CD24(+)]. Les CSN peuvent être aussi purifiées grâce à leur caractéristique de cellules ciliées (Beckervordersandforth et al., 2010). De jeunes souris GFAP::GFP ont été utilisées, et les cellules de la ZSV ont été marquées avec un anticorps fluorescent reconnaissant une protéine spécifique des cils des cellules gliales pendant le développement : la prominin-1 (ou CD133 chez l'humain). Les cellules GFAP::GFP(+)-Prominin1(+) ont été isolées et identifiées comme cellules de type B1, et les voies caractéristiques associées ont été évaluées par analyse transcriptomique globale (microarray). Cette étude a démontré l'importance des voies de signalisation liées à la formation du cil primaire chez les CSN et notamment de la protéine ciliaire IFT88 dont la délétion diminue fortement la prolifération dans la ZSV (Beckervordersandforth et al., 2010). Enfin, l'utilisation du marqueur membranaire LeX permet de trier une population enrichie en CSN sans utiliser des souris transgéniques (Capela and Temple, 2002). Les cellules LeX⁺ représentant seulement 4% des cellules peuplant la ZSV, sont enrichies en cellules formants des

neurosphères *in vitro*. De plus, elles expriment la GFAP et se divisent au bord des ventricules latéraux *in vivo*, caractéristiques des CSN (Capela and Temple, 2002).

Le tableau 2 récapitule les principaux marqueurs permettant de distinguer les CSN et de leurs cellules filles dans la ZSV connus à ce jour.




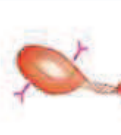

	Cellule souche neurale	Cellule souche neurale "activée"	Progéniteur nerveux	Neuroblaste immature	Neuroblaste migrant	References
type	B1		C	A		
						
GFAP	+++	++	-	-	-	Doetsch et al. 1999a
Prominin-1 (CD133)	+++	++	-	-	-	Beckervordersandforth et al. 2010
GLAST	+++	+++	+/-	-	-	Boiteus and Bordey 2004
LeX (CD15)	+++	++	+/-	-	-	Capela and Temple 20002
TLX	++	++	+/-	-	-	Liu et al. 2008
Nestin	++	++	+	+/-	+/-	Kukekov et al. 1997
Mash1	+/-	+/-	+++	++	-	Kim et al. 2007
EGFR	-	++	+++	++	-	Doetsch et al. 2002
Dlx2	-	?	++	++	+	Doetsch et al. 2002
DCX	-	-	-	++	+++	Gleeson et al. 1999
CD24	-	-	-	+	+	Rietze et al. 2001
PSA-NCAM	-	-	-	++	+++	Hu et al. 1996

Tableau 2 : Principaux marqueurs des CSN et leurs cellules filles dans la ZSV

On définit dans ce tableau 5 principaux types cellulaires peuplant la ZSV, des cellules souches neurales quiescentes aux neuroblastes migrants vers les bulbes olfactifs. Les CSN en prolifération expriment l'EGFR représenté ici par des petits récepteurs en rose (Doetsch et al., 2002, Pastrana et al., 2009), avant de se différencier en progéniteurs nerveux. Ces cellules de type C vont se différencier en neuroblastes dans la ZSV en gardant l'expression de l'EGFR (Kim et al., 2009). Ces neuroblastes EGFR⁺ perdent l'expression de l'EGFR au cours de leur migration dans le RMS (Kim et al., 2009). En bleu sont recensés les principaux

marqueurs connus et utilisés à ce jour pour caractériser les CSN. En jaune sont indiqués les marqueurs caractéristiques des progéniteurs. Les neuroblastes sont régulièrement identifiés par les marqueurs surlignés ici en rouge.

3. MODIFICATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES DE LA NEUROGENESE ADULTE

3.1 Stimulation par l'enrichissement, l'exercice ou la gestation

De plus en plus de preuves accordent à la neurogenèse adulte des fonctions cérébrales spécifiques, comme l'apprentissage des odeurs pour la neurogenèse dans la ZSV, et la formation de la mémoire spatiale ainsi que les effets comportementaux des traitements antidépresseurs pour la neurogenèse dans la ZSG de l'hippocampe (Gheusi et al., 2000, Santarelli et al., 2003, Kempermann et al., 2004, Zhang et al., 2008). De nombreux facteurs environnementaux, ainsi que la stimulation des activités neuronales ont une influence sur les différentes étapes de la neurogenèse adulte. Les conditions de vie des animaux en laboratoire sont plutôt sommaires et il a été montré que la neurogenèse pouvait être stimulée lorsque l'on enrichissait l'environnement des souris. L'enrichissement de l'environnement consiste à placer les animaux dans des cages plus grandes, dans de plus grands groupes, favorisant ainsi les interactions sociales entre les animaux. Si la multiplication des cellules souches et des progéniteurs nerveux de la ZSV n'est pas stimulée, la survie des nouveaux neurones dans le bulbe olfactif est nettement améliorée (Rocheffort et al., 2002). Chez les rongeurs, les capacités olfactives (mémorisation et discrimination des odeurs) semblent corrélées avec l'intensité de la neurogenèse dans la ZSV. Si les capacités olfactives des animaux sont peu exploitées, alors la survie des neurones dans le bulbe olfactif est fortement réduite (Corotto et al., 1994). Par ailleurs, des études ont montré que l'exercice physique augmentait la multiplication et la différenciation des CSN et progéniteurs nerveux dans l'hippocampe (van Praag et al., 2000). L'accroissement du nombre de neurones produits suite à l'exercice pourrait résulter d'une élévation du taux de sérotonine ou de facteurs neurotrophiques qui stimuleraient la survie des neurones nouvellement formés. Les neurones ainsi générés s'intègrent dans l'hippocampe et améliorent les capacités de mémorisation des souris, évaluées grâce à des tests comportementaux (van Praag et al., 2000). Chez la souris, l'augmentation des taux d'œstrogènes circulants pendant la gestation stimule la production de neurones au niveau du gyrus denté de l'hippocampe (Tanapat et al., 1999). Par ailleurs, il a été montré que la

synthèse de prolactine chez les souris, au cours de la gestation et post partum, augmente la neurogenèse dans la ZSV ainsi que la production de nouveaux neurones dans le bulbe olfactif (Shingo et al., 2003). Cependant, cette stimulation de la neurogenèse produisant de nouveaux neurones dans le bulbe olfactif, elle pourrait permettre d'améliorer les capacités de reconnaissance des mères pour leurs petits. Cette hypothèse a été infirmée car l'irradiation de la ZSV permettant le blocage de la neurogenèse dans les bulbes olfactifs ne semble pas affecter l'instinct maternel des femelles, ni leur capacité à reconnaître leur progéniture (Feierstein et al., 2010).

3.2 Reprise de la neurogenèse après ischémie cérébrale

L'accident vasculaire cérébral ischémique est causé par l'occlusion de l'artère cérébrale qui entraîne la perte ou la réduction de la circulation sanguine dans le cerveau. Cette occlusion mène à un infarctus qui entraîne la mort des neurones, astrocytes et oligodendrocytes dans la région ischémisée (Dirnagl et al., 1999). La stimulation des CSN endogènes peut permettre le remplacement neuronal des zones ischémisées. En utilisant la technique d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne (MCAO) chez les rongeurs adultes, on observe une stimulation de la prolifération cellulaire et la neurogenèse dans la ZSV et la ZSG (Arvidsson et al., 2002) (Jin et al., 2001) (Zhang et al., 2001). Deux semaines après lésion ischémique, les neuroblastes nouvellement formés se dirigent vers la zone lésée où certains se différencient en neurones matures (Kokaia and Lindvall, 2003) (Lindvall et al., 2004). Les neuroblastes issus de la ZSV peuvent remplacer les neurones endommagés après lésion cérébrale dans l'hippocampe, le striatum, le néocortex et d'autres régions endommagées du système nerveux central (Jin et al., 2003b) (Kuge et al., 2009) (Zhang et al., 2001). Cependant, le nombre de neurones produits par les CSN endogènes est très faible (environ 0,2% des cellules striatales perdues), et la survie des nouveaux neurones dans les régions ischémisées est limitée (Arvidsson et al., 2002). Une stimulation de la prolifération dans la ZSV et la ZSG a aussi été prouvée sur des modèles expérimentaux artificiels de traumatismes craniocérébraux, crises d'épilepsie ou ischémie globale, dans la première semaine suivant la lésion (Kernie and Parent, 2010). Les CSN adultes endogènes présentent un fort potentiel d'application thérapeutique pour la réparation nerveuse mais leur utilisation nécessite

une meilleure compréhension des facteurs régulant leur prolifération et leur différenciation (Barkho and Zhao, 2011). Ces différentes études sur la régulation de la neurogenèse par des modifications physiopathologiques ne sont que quelques exemples dans un domaine qui ne cesse de se développer (figure 9).

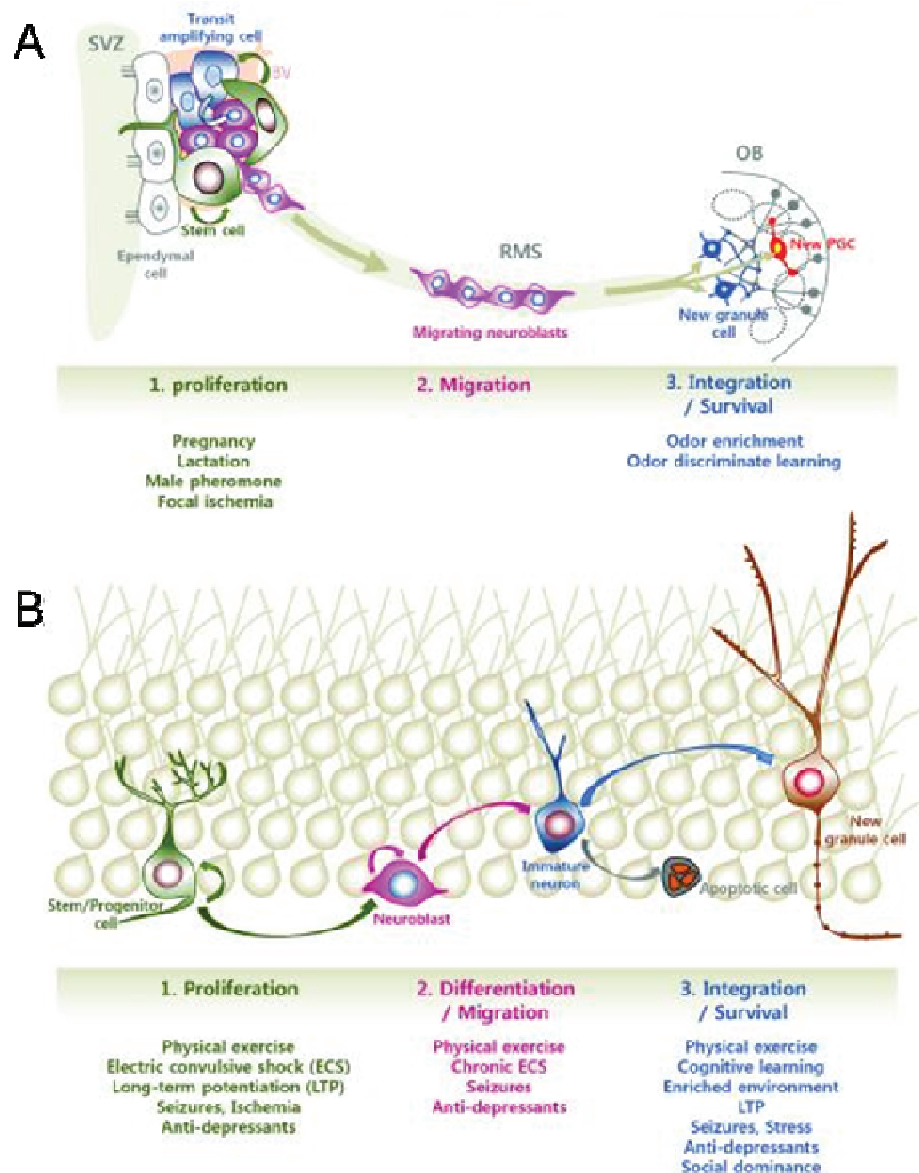


Figure 9 : Régulation physiologique et physiopathologique de la neurogenèse adulte

(A) Influence de différentes activités sur la neurogenèse issue de la ZSV. L'intégration de nouveaux neurones dans les circuits préexistants sont influencées par les expériences liées à l'odorat. (B) Influence de différentes activités sur la neurogenèse issue de la ZSG. Figure issue de (Ma et al., 2009).

3.3 Rayonnements ionisants et neurogenèse

3.3.1 Irradiation du système nerveux central

Les rayonnements ionisants sont des rayonnements capables de créer une ionisation, c'est à dire capables d'arracher un électron à une molécule. Ils sont produits par la décroissance d'éléments radioactifs (Cobalt60, Cesium167) ou par des rayonnements ionisants électromagnétiques (rayons X). La dose absorbée correspond à la quantité d'énergie moyenne délivrée par le rayonnement traversant la matière. Cette quantité d'énergie est communément exprimée en Gray (Gy). La radiothérapie constitue un des traitements majeurs pour les tumeurs primaires du cerveau, ainsi que les métastases cérébrales ou les cancers « tête et cou ». Des altérations structurelles et fonctionnelles sévères apparaissent pour des traitements à forte dose (>60 Gy) (Tofilon and Fike, 2000). Des doses plus faibles (18-24Gy) peuvent créer des troubles cognitifs, mais ne semblent pas entraîner d'altérations majeures de la morphologie cellulaire (Roman and Sperduto, 1995). Des dommages dans le cerveau dus aux traitements par radiothérapie sont parfois observés, incluant des anomalies dans la zone périventriculaire (Stylopoulos et al., 1988).

3.3.2 Les effets cellulaires des rayonnements ionisants

Les rayonnements ionisants entraînent des altérations structurales de l'ensemble des constituants cellulaires (ADN, protéines et lipides). Ils peuvent modifier les bases de l'ADN, induire des pontages, des cassures de l'ADN, et endommager les protéines et les lipides. Les rayonnements ionisants induisent la radiolyse de l'eau, ce qui génère des ROS (pour reactive oxygen species). Les éléments libérés sont H_2 , H_2O_2 et les radicaux libres : $OH\cdot$, H_2O . qui provoquent un stress oxydant. Ces éléments peuvent interagir avec les composants biologiques, entraînant leur modification chimique : les lipides peuvent être peroxydés, les protéines oxydées et l'ADN lésé. Au niveau cellulaire, les rayonnements ionisants ont deux conséquences majeures : un arrêt du cycle cellulaire pour permettre la réparation de l'ADN ou l'induction de l'apoptose lorsque les cassures de l'ADN ou les altérations des macromolécules sont trop importantes pour être réparées. L'induction de l'apoptose par l'activation de la

protéine p53 comporte trois niveaux de régulations : l'activation de la transcription du gène codant pour p53, des modifications post-traductionnelles comme sa phosphorylation (Melchior and Hengst, 2002) et sa dégradation par le protéasome, dépendante de mdm2 (Haupt et al., 1997). Dans de nombreux types cellulaires, l'arrêt en phase G1 du cycle cellulaire induit par les radiations ionisantes dépend de p53, qui transactive l'expression du gène codant pour p21waf (el-Deiry et al., 1993). Cependant, dans les cellules souches et progéniteurs nerveux du cerveau murin embryonnaire, il n'y a pas d'arrêt en G1 p21-dépendant en réponse à l'irradiation, et l'apoptose dépend de l'expression de p21 dans les cellules neurales (Roque et al., 2012). Lorsque les dégâts sont trop importants pour être réparés par la machinerie cellulaire, p53 induit la mort par apoptose en activant l'expression de gènes pro-apoptotiques comme Bax ou Fas (Ding and Fisher, 1998).

3.3.3 Effets de l'irradiation sur la ZSV et la ZSG

Les dommages dus aux traitements de radiothérapie peuvent venir d'une sensibilité des progéniteurs nerveux, qui limiterait la capacité de régénération de la ZSV (Hopewell, 1979) (Tofilon and Fike, 2000). De même, les cellules de la ZSG sont particulièrement sensibles à l'irradiation, entrant en apoptose dès 0,4 Gy (Nagai et al., 2000). Chez les rongeurs, le pic d'apoptose se situe entre 6 et 12h après exposition de la tête aux radiations et l'apoptose est quasiment terminée 24h après exposition (Mizumatsu et al., 2003). Après une dose de rayons X de 2 Gy sur le cerveau de rats adultes (Hopewell and Cavanagh, 1972) on observe une diminution rapide des mitoses le long de la ZSV, mais l'index mitotique est rétabli après 1 mois, et après 12 mois les ZSV des animaux irradiés semblent identiques aux ZSV des animaux non irradiés. En revanche, les animaux irradiés à 40Gy présentent une très faible régénération des cellules de la ZSV (Cavanagh and Hopewell, 1972). Ces résultats montrent que la réponse à l'irradiation dans les zones neurogéniques du cerveau adulte est dépendante de la dose administrée. Tada et coll. ont remarqué, en irradiant les cerveaux de jeunes rats adultes avec des doses variant de 2 à 15 Gy, que l'irradiation atteint tous les types cellulaires peuplant la ZSV. Cependant, les progéniteurs et les cellules en prolifération semblaient radio-sensibles dès 1 ou 2 Gy tandis que les cellules de type astrocytaire GFAP+ sont beaucoup moins radio-sensibles (Tada et al., 1999) (figure 10). La prolifération cellulaire dans la ZSV

reprend quelques jours après une irradiation à doses modérées (2-10 Gy) alors que pour des doses excédant 10Gy, le blocage de la neurogenèse semble permanent (Tada et al., 1999). Les CSN survivent à des doses de 10Gy, mais elles perdent leur capacité à produire de nouveaux neurones (Achanta et al., 2012). Une irradiation ciblée de la ZSV a forte dose (15Gy) bloque la production de nouveaux neurones dans les bulbes olfactifs pendant plusieurs mois (Lazarini et al., 2009). De même, l'irradiation ciblée de la ZSG à forte dose (10Gy) bloque la neurogenèse hippocampique pendant plusieurs mois (Ford et al., 2011).

3.3.4 Modèles d'irradiation des zones neurogeniques

Les effets de l'irradiation sur la neurogenèse adulte peuvent se classer selon deux plages de doses. A des doses faibles à modérées (de 0,5 à 5Gy), on observe une mort de la quasi-totalité des cellules en prolifération, mais la neurogenèse repart quelques jours après irradiation, permettant de repeupler rapidement les zones neurogéniques (figure 10) (Hopewell and Cavanagh, 1972) (Tada et al., 1999) (Tada et al., 2000). L'irradiation à dose faible ou modérée a été largement utilisée pour interrompre la neurogenèse de façon transitoire (Monje et al., 2002) (Wojtowicz, 2006) (Santarelli et al., 2003) (Saxe et al., 2006) (Rola et al., 2004) (Hellstrom et al., 2009) (McGinn et al., 2008). Elle permet de construire un modèle pour étudier les effets de la neurogenèse adulte au niveau comportemental sans affecter les neurones matures (Wojtowicz, 2006). A 10Gy ou des doses excédant 10Gy, la neurogenèse est bloquée pendant plusieurs mois et le repeuplement des zones neurogeniques n'est que partiel, voire inexistant (figure 10) (Tada et al., 1999) (Ford et al., 2011) (Lazarini et al., 2009) (Achanta et al., 2012). Le blocage de la neurogenèse à long terme est accompagné par une perturbation de la mémoire olfactive (Valley et al., 2009) (Lazarini et al., 2009) et de la mémoire spatiale (Raber et al., 2004) (Monje et al., 2002) (Rola et al., 2004). Ainsi, l'irradiation constitue un modèle puissant de « hit and run » permettant simplement en contrôlant la dose administrée d'étudier la reprise de la neurogenèse à court terme ou les effets de sa perturbation à long terme.

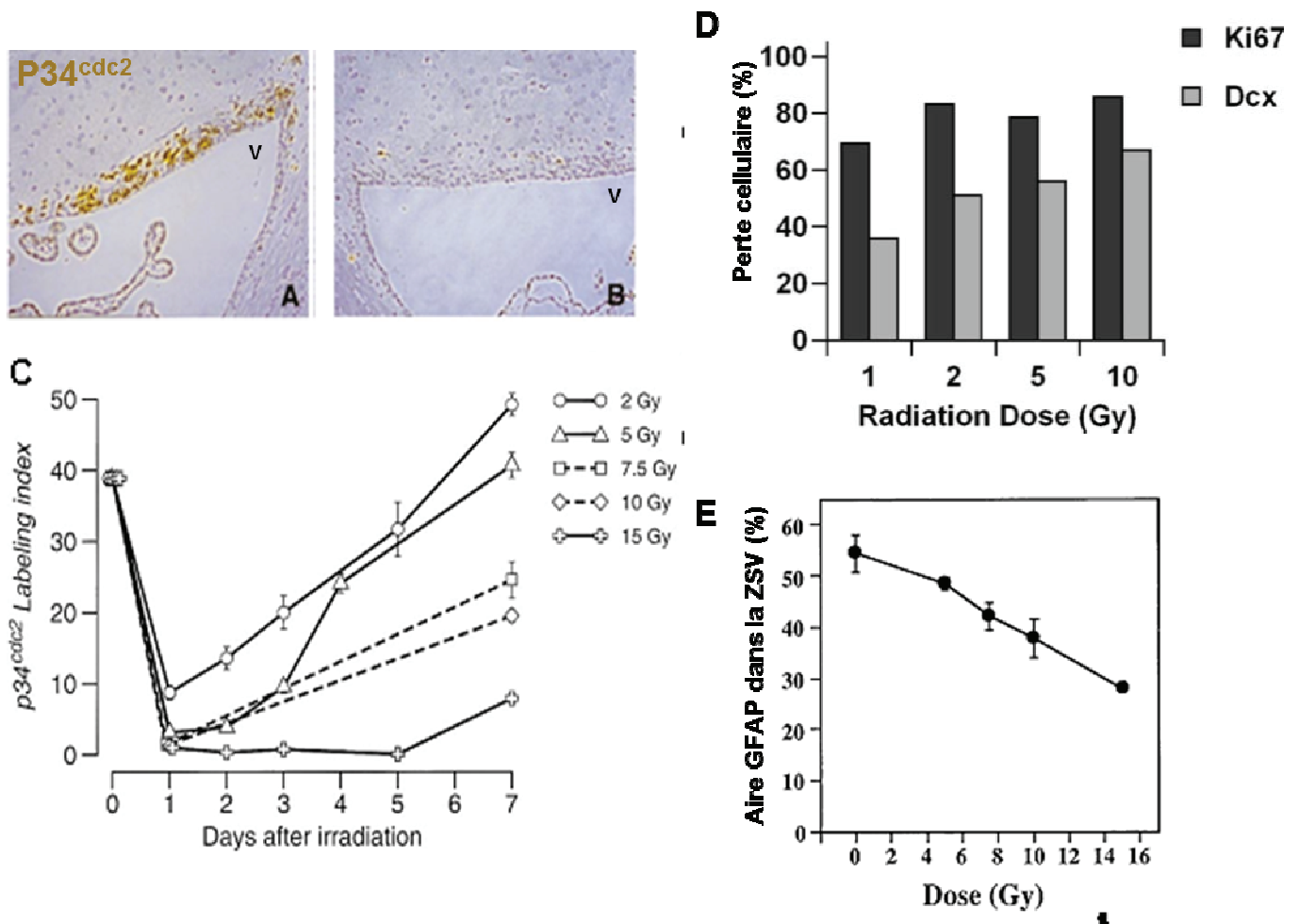


Figure 10 : Effets-doses de l'irradiation sur la neurogenèse dans la ZSV et la ZSG

Différentes doses de rayons X ont été dirigées sur le cerveau de jeunes rats adultes. (A) ZSV normale marquée avec la cdk p34^{cdc2} exprimée par les cellules en prolifération. (B) 24h après une dose unique de 5Gy, la quasi-totalité des cellules en prolifération a disparu (C) Les cellules recommencent à proliférer peu à peu sous 7 jours suivant l'irradiation. (D) Dès les faibles doses (1Gy), on observe une forte apoptose des neuroblastes (Dcx) et des cellules en prolifération (ki67) peuplant la ZSG. Adapté de (Andres-Mach et al., 2008). (E) Les cellules de type astrocytaire GFAP+ sont résistantes aux faibles doses, et sensibles à l'irradiation qu'à des doses plus élevées. Adapté des résultats de (Tada et al., 1999).

3.4 Vieillessement des niches neurogéniques

3.4.1 Chez la souris

La neurogenèse persiste chez les individus adultes dans l'hippocampe et au bord des ventricules latéraux. Cependant, de nombreuses études prouvent qu'elle décline avec le vieillissement, impactant le remplacement des neurones et les capacités de régénération des zones neurogéniques après lésions cérébrales. Avec le vieillissement, de nombreuses caractéristiques de la niche neurogénique changent irrémédiablement. Les ventricules latéraux se referment, entraînant une détérioration de la ZSV ventrale et latérale. Ainsi la région neurogénique se limite peu à peu à la région dorsale du ventricule latéral (Luo et al., 2006). L'analyse par microscopie électronique de la ZSV de jeunes souris adultes (2 mois) comparées à des souris d'âge moyen (10 mois) et des vieilles souris (22 mois) a montré un affinement progressif de la ZSV. Le nombre de neuroblastes diminue sensiblement avec l'âge, ainsi que les progéniteurs nerveux, tandis que le nombre de cellules épendymaires bordant le ventricule et d'astrocytes peuplant la ZSV est peu altéré (Luo et al., 2006) (Bouab et al., 2011) (figure 11). La production de nouveaux neurones dans les bulbes olfactifs diminue sensiblement entre les jeunes souris adultes et les vieilles souris (Enwere et al., 2004) (Luo et al., 2006) (Ahlenius et al., 2009). Ceci entraîne des dysfonctionnements dans les tests de discrimination des odeurs. Les souris âgées peuvent distinguer deux odeurs différentes, comme les jeunes adultes, mais ne peuvent pas distinguer deux odeurs très similaires (distinction fine) contrairement aux jeunes adultes (Enwere et al., 2004). La diminution de la neurogenèse dans la ZSG et la ZSV est essentiellement due à la diminution du nombre de CSN/progéniteurs nerveux en prolifération au cours du vieillissement (figure11) (Kempermann et al., 1998) (Lemaire et al., 2000) (Enwere et al., 2004) (Cuppini et al., 2006). Si la réduction du nombre de cellules en prolifération dans les zones neurogéniques est bien établi, en revanche, il semble que la capacité de prolifération intrinsèque des progéniteurs ne soit pas altérée, du moins jusqu'à l'âge moyen, la proportion de cellule Ki67 dans la ZSV restant inchangée, ainsi que leur capacité à former des neurosphères (Bouab et al., 2011). De plus la survie et la différenciation des progéniteurs et neuroblastes formés ne semblent pas affectées par le

vieillessement (Rao et al., 2005) (Lichtenwalner et al., 2001) (McDonald and Wojtowicz, 2005) (Bondolfi et al., 2004). Ainsi, la diminution de la neurogenèse adulte au cours du vieillissement de la ZSG et de la ZSV murine pourrait provenir d'une altération de la prolifération des CSN, tandis que leur stock reste constant (Lugert et al., 2010) (Bouab et al., 2011). Cependant, les mécanismes entraînant le vieillissement des niches neurogéniques restent grandement incompris.

3.4.2 Chez l'humain

On a longtemps débattu sur la diminution de la neurogenèse dans le cerveau adulte humain durant le vieillissement à savoir si la génération de nouveaux neurones était suffisante pour participer aux fonctions cérébrales (Kempermann, 2012) (Rakic, 1985). Une étude pionnière a démontré l'existence d'une neurogenèse dans le cerveau adulte humain, mais sans évaluer la quantité de nouveaux neurones produits (Eriksson et al., 1998). La plupart des études qui ont tenté d'évaluer la neurogenèse dans le cerveau adulte humain ont quantifié le nombre de neuroblastes (Dcx^+) dans la ZSV et la ZSG (Knoth et al., 2010) (Sanai et al., 2011) (Wang et al., 2011). Il en ressort une dynamique très similaire entre les deux régions, qui contiennent un nombre important de neuroblastes juste après la naissance qui décroît fortement durant la première année puis plus modérément pendant l'enfance et l'âge adulte (Knoth et al., 2010, Goritz and Frisen, 2012) (Sanai et al., 2011) (Wang et al., 2011). La forte perte du nombre de neuroblastes dans la ZSV ainsi qu'un chemin de migration encore non élucidé suggère que la production de nouveaux neurones destinés aux bulbes olfactifs est négligeable voire inexistante dans le cerveau adulte humain (Arellano and Rakic, 2011) (Sanai et al., 2011) (Wang et al., 2011). Des études récentes ont évalué l'âge des neurones des zones neurogéniques humaines en évaluant la concentration en Carbone 14 et en la ramenant au niveau atmosphérique au moment de la naissance de l'individu. Ces expériences ont montré que dans l'hippocampe humain, 700 nouveaux neurones sont produits par jour, ce qui correspond à un remplacement de 1,75% des neurones en un an. Ainsi, le nombre de neurones produits dans l'hippocampe à l'âge adulte moyen est comparable entre l'homme et la souris, ce qui suggère fortement que la neurogenèse dans l'hippocampe adulte pourrait participer aux fonctions cérébrales humaines (Spalding et al., 2013) . En revanche la production de nouveaux neurones

dans les bulbes olfactifs humains après la naissance est quasi inexistante, et si elle existe, moins de 1% des neurones sont remplacés en plus d'un siècle (Bergmann et al., 2012). Cependant, la bande d'astrocytes GFAP⁺ de la ZSV existe dans le cerveau adulte humain (Sanai et al., 2004) (Quinones-Hinojosa et al., 2006) (Oldham et al., 2008) et la présence de cellules souches quiescentes dans la ZSV n'est pas exclue (Curtis et al., 2007, Sanai et al., 2007, Sanai et al., 2011). Une meilleure compréhension des facteurs régulant la prolifération des CSN dans les zones neurogéniques pourrait permettre de les recruter et les stimuler à des fins thérapeutiques.

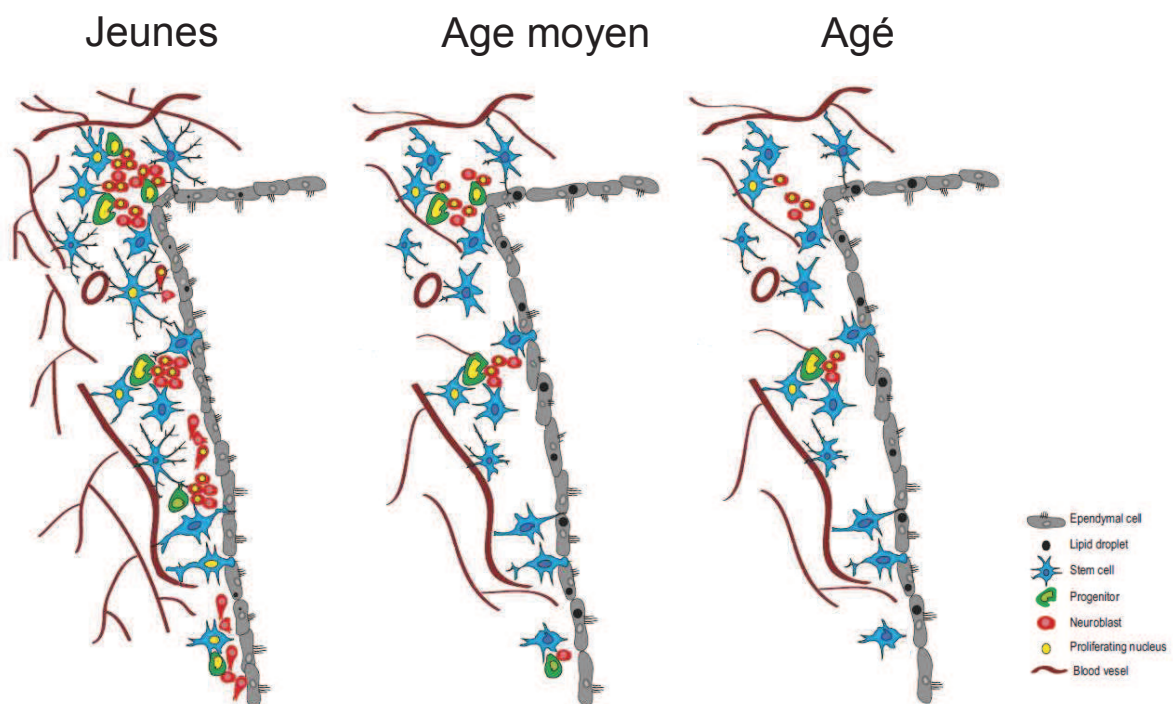


Figure 11 : Représentation schématique des effets du vieillissement sur la ZSV

Dès l'âge moyen (12 mois), un nombre conséquent de cellules en prolifération (noyau jaune) disparaissent de la ZSV. Bien que le nombre de cellules souches (en bleu) semble rester stable, elles prolifèrent moins *in vivo*, entraînant une perte progressive des cellules de type C et A (Bouab et al., 2011).

4. REGULATION MOLECULAIRE DE LA NEUROGENESE ADULTE

Depuis la « redécouverte » de la neurogenèse adulte au milieu des années 1990 (voir avant-propos), de très nombreuses études ont tenté d'élucider les mécanismes qui la régulent, son rôle fonctionnel ainsi que ses potentielles applications thérapeutiques. Bien que de nombreuses recherches sur les thérapies associées aux CSN se développent pour espérer traiter les troubles cérébraux comme les AVC, maladie de Parkinson, maladie de Huntington ou la sclérose en plaques, la plupart n'en sont qu'au stade de modèles expérimentaux animaux. De nombreux progrès doivent être réalisés pour assurer un fonctionnement efficace des thérapies et une possible transition vers la clinique. Cela nécessite notamment une parfaite compréhension des mécanismes régulant la prolifération cellulaire dans les phases précoces de la neurogenèse adulte, afin de permettre l'expansion de la production endogène de précurseurs neuronaux pouvant migrer vers les zones cérébrales lésées.

4.1 Régulation de la prolifération cellulaire dans les phases précoces de la neurogenèse adulte

4.1.1 Facteurs de croissance EGF, FGF-2, VEGF et IGF

Les facteurs de croissance jouent un rôle important dans la dynamique de la régulation de la neurogenèse adulte. Les cellules souches et progéniteurs nerveux des zones neurogéniques du cerveau adulte expriment les récepteurs de nombreux facteurs de croissance. Dans la ZSV, les CSN activées ainsi que les progéniteurs nerveux expriment le récepteur à l'EGF et forment des neurosphères *in vitro* en présence de EGF et FGF-2 (Doetsch et al., 2002) (Reynolds and Weiss, 1992). L'EGF favorise la prolifération des progéniteurs nerveux dans la ZSV. Sous l'effet de l'EGF, *in vitro*, les progéniteurs de la ZSV arrêtent de produire des neuroblastes et entrent en prolifération (Doetsch et al., 2002), ce qui suppose un rôle essentiel de la voie de l'EGF dans la prolifération des cellules de type C et dans le blocage de leur

différenciation en neuroblastes (figure 12). *In vivo*, l'injection de TGF α , ligand physiologique de l'EGFR, induit une prolifération rapide des cellules de type C et un élargissement de la ZSV (Fallon et al., 2000). Dans la ZSV, le FGF-2 (fibroblast growth factor 2) affecte les phases précoces de la neurogenèse, en favorisant la prolifération des cellules de type C et en permettant d'augmenter le nombre de neuroblastes migrant vers les bulbes olfactifs (Mudo et al., 2009). Le VEGF (pour vascular endothelial growth factor) est un facteur de croissance qui favorise l'angiogenèse et produit des effets neurotrophiques. Il stimule la prolifération et la production des neuroblastes dans la ZSV (Jin et al., 2002). Enfin, IGF II favorise l'autorenouvellement des CSN et progéniteurs *in vitro* via le récepteur à l'insuline (Ziegler et al., 2012).

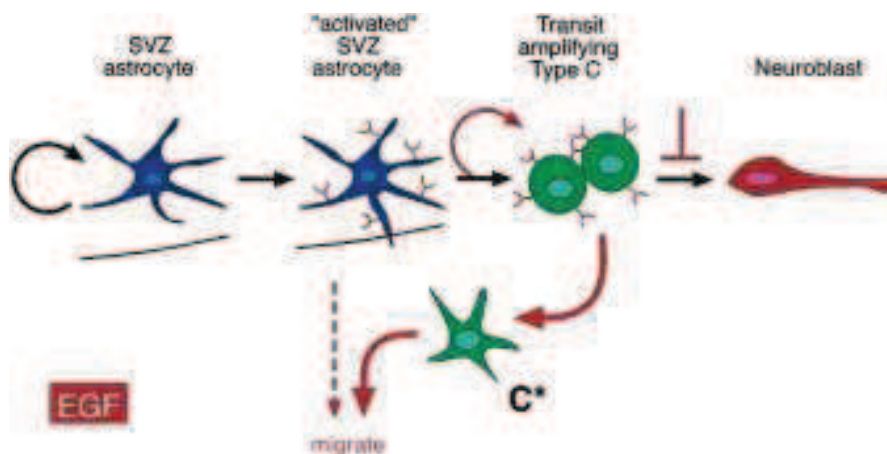


Figure 12 : Stimulation de la prolifération des CSN et progéniteurs dans la ZSV

La stimulation par l'EGF entraîne une prolifération intensive des cellules de type C et bloque leur différenciation en neuroblastes. Une exposition prolongée à l'EGF entraîne une reprogrammation des cellules de type C en cellules astrogliales (C*) qui répondent aussi à l'EGF et deviennent migrantes (Doetsch et al., 2002).

4.1.2 La voie Sonic Hedgehog (Shh)

La voie de signalisation Sonic hedgehog (Shh) a d'abord été décrite dans le néocortex embryonnaire où elle stimule la prolifération des cellules souches et progéniteurs nerveux (Palma and Ruiz i Altaba, 2004). Chez l'adulte, la croissance *in vitro* des progéniteurs nerveux issus de la ZSG est fortement dépendante de Shh et *in vivo*, la surexpression de Shh via un vecteur adénoviral permet d'augmenter la prolifération des CSN et progéniteurs nerveux dans la ZSG (Lai et al., 2003). A l'inverse l'inhibition de la voie Shh par la cyclopamine réduit la prolifération des progéniteurs de l'hippocampe *in vivo* (Lai et al., 2003). L'inactivation conditionnelle de Smoothened, la protéine trans-membranaire nécessaire à la voie de signalisation Shh, réduit la prolifération des progéniteurs nerveux dans la ZSG et dans la ZSV, réduisant ainsi la production de nouveaux neurones dans les deux zones (Machold et al., 2003). Shh favorise la prolifération des CSN de la ZSV par une action synergique avec l'EGF (Palma and Ruiz i Altaba, 2004, Palma et al., 2005). En effet, dans la ZSV, Shh régule la prolifération des CSN et cellules de type C *in vitro* en agissant comme mitogène en coopération avec l'EGF (Palma et al., 2005). Des expériences de perfusions intracérébrales d'Ara-C, agent anti-mitotique ciblant les cellules en prolifération, ont démontré que la signalisation Shh est nécessaire à la régénération des cellules de type C et de type A (Ahn and Joyner, 2005).

4.1.3 La voie Notch

La voie de signalisation Notch fait partie des voies de signalisation la mieux conservée chez les animaux. Notch est un récepteur, et chez les mammifères il existe quatre récepteurs Notch (Notch1, Notch2, Notch3 et Notch4), et de nombreux ligand, comme Jagged 1 (JAG1) et JAG2, ainsi que les protéines Dll (delta-like) (Ables et al., 2011). De façon intéressante, dans l'embryon, le niveau d'activation de la voie Notch régule directement la prolifération des CSN : une faible activation favorise la prolifération alors qu'une forte activation de la voie entraîne un arrêt du cycle cellulaire (Guentchev and McKay, 2006). Les implications de la voie Notch dans les zones neurogéniques du cerveau adulte sont multiples, nous nous intéresserons ici seulement à son implication dans la régulation de la prolifération des phases précoces de la neurogenèse. Notch permet de maintenir le stock de CSN

dans les niches neurogéniques, en régulant le cycle cellulaire pour contrôler la production de cellules filles. En effet, dans la ZSG des souris n'exprimant plus Notch, on observe une sortie de cycle des progéniteurs nerveux (Breunig et al., 2007), une altération de l'expansion de leur stock (Ables et al., 2010) ainsi qu'une perte du stock de CSN (Imayoshi et al., 2010).

4.1.4 La voie de signalisation Wnt/ β catenine

La voie de signalisation Wnt/ β catenine est impliquée dans la régulation de la prolifération des CSN lors du développement embryonnaire (Hirabayashi and Gotoh, 2005). Très conservée au fil de l'évolution, la voie Wnt/ β catenine assure lors du développement de l'embryon chez les mammifères la différenciation de la zone dorsale du télencéphale à l'origine du néocortex et de l'hippocampe (Lee and Jessell, 1999). La surexpression de Wnt1 lors de l'embryogenèse stimule la prolifération des cellules souches et progéniteurs nerveux situées au bord des ventricules (Dickinson et al., 1994). Dans le cerveau adulte, Wnt3, un ligand de la famille Wnt, produit par les astrocytes de la ZSG, stimule la neurogenèse au niveau de l'hippocampe, en activant la multiplication des progéniteurs et des neuroblastes au niveau de la ZSG (Lie et al., 2005). La surexpression de Wnt3 est en effet suffisante pour augmenter la prolifération des progéniteurs nerveux de l'hippocampe *in vitro* et *in vivo*. A l'inverse, le blocage de la voie Wnt abolie presque complètement la neurogenèse *in vivo*, ce qui montre le rôle primordial de la voie Wnt dans la régulation de la neurogenèse adulte au niveau de l'hippocampe (Lie et al., 2005). Dans la ZSV, la prolifération des progéniteurs dépend de la voie de signalisation de la β catenine (Adachi et al., 2007). L'activation de cette voie entraîne une accumulation de β catenine dans le noyau, activant la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire. A l'inverse, la surexpression de Dkk1, un inhibiteur de la voie de signalisation Wnt, réduit la prolifération des cellules Mash1+, représentant les cellules de type C (Adachi et al., 2007). Ainsi, La voie de signalisation Wnt apparait comme un régulateur important de la neurogenèse adulte, favorisant leur prolifération et la production de précurseurs neuronaux dans la ZSV et la ZSG.

4.1.5 La superfamille des TGFβ

La superfamille des TGFβ (Transforming Growth Factor β) comporte des acteurs de premier plan dans les domaines de la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose. Cette famille est composée des TGFβ, des activines et des BMP (bone morphogenic proteins). Dans le cerveau adulte, les BMP2,4, leurs récepteurs Bmpr1A,B et BmprII ainsi que leur antagoniste Noggin, sont exprimés dans la ZSV (Lim et al., 2000) (Valenzuela et al., 1995, Soderstrom et al., 1996). Le TGFβ1 est un inhibiteur de la neurogenèse car il réduit la prolifération des progéniteurs nerveux *in vitro*, et diminue ainsi la production de nouveaux neurones chez l'adulte (Wachs et al., 2006). Les BMP font aussi figure d'inhibiteurs de la neurogenèse adulte dans la ZSV. Les BMP dans la ZSV sont produites par les cellules endothéliales, et réduisent la prolifération des CSN et progéniteurs nerveux *in vitro* en activant la voie BMP/Smad (Mathieu et al., 2008). Cependant, la délétion de Smad4, activée par la voie des BMP mais aussi par la voie du TGFβ et des activines, diminue la production de neurones et favorise la création d'oligodendrocytes plutôt que de favoriser la neurogenèse (Colak et al., 2008). Le rôle des BMP n'est pas encore clair dans la régulation de la neurogenèse adulte et mérite d'être clarifié.

4.1.6 Ephrines

Les Ephrines ainsi que leur récepteurs Eph tyrosine kinase sont exprimés dans la ZSV et jouent un rôle dans la prolifération des progéniteurs nerveux. Le ligand ephrin-B2, en activant son récepteur EphB2 induit la voie de signalisation Eph/Ephrin qui favorise la prolifération des progéniteurs nerveux dans la ZSV adulte (Conover et al., 2000). L'ephrin-A2, par l'interaction avec l'EphA7, a une influence négative sur la prolifération des progéniteurs nerveux (Holmberg et al., 2005).

4.1.7 Neurotransmetteurs

Les neurotransmetteurs sont, de manière générale, relargués dans l'environnement synaptique, et sont à la base des communications chimiques entre neurones. Des études ont montré que ces molécules ont des fonctions importantes pendant la vie embryonnaire (Behar et al., 1994) (Behar et al., 1998) (Platel et al., 2005) ainsi que

dans la neurogenèse adulte au niveau de la ZSG (Gould et al., 1994) (Cameron et al., 1995). Plus récemment, des études ont montré d'importantes implications des neurotransmetteurs dans la régulation de la prolifération cellulaire dans la neurogenèse adulte.

a) Signaux dopaminergiques

Les récepteurs de la dopamine sont des récepteurs couplés aux protéines G et classés comme « D₁-like » (D₁ et D₅) ou « D₂-like » (D₂, D₃ et D₄) selon leurs homologues de structure (Callier et al., 2003). Dans la ZSV adulte, des autographies et autres hybridations *in situ* ont montré une forte expression du récepteur D₃ (Diaz et al., 1997). Les récepteurs « D₂-like » sont exprimés sur les progéniteurs nerveux, tandis que les neuroblastes expriment à la fois les récepteurs « D₁-like » et « D₂-like » (Hoglinger et al., 2004). Au niveau des fonctions véhiculées par les signaux dopaminergiques, on sait par exemple que les individus atteints de la maladie de Parkinson présentent une perturbation des signaux dopaminergiques. Il en résulte une diminution de la prolifération cellulaire dans la ZSV (Hoglinger et al., 2004). Les agonistes de la dopamine favorisent la neurogenèse dans les modèles murins de la maladie de Parkinson (Yang et al., 2008), et la destruction des neurones dopaminergiques de la substance noire diminue le nombre de cellules en prolifération dans la ZSV d'environ 40% (Baker et al., 2004). Cet effet semble être dépendant de l'activation des récepteurs « D₂-like » sur les progéniteurs nerveux et plus particulièrement le récepteur D₃ (Coronas et al., 2004). Cependant, les innervations dopaminergiques semblent varier en fonction de la lignée de souris utilisée (Baker et al., 2005). L'action positive de la dopamine sur la prolifération cellulaire dans la ZSV se fait via l'activation de l'EGFR. En effet, en réponse à la dopamine, les cellules de type C produisent de l'EGF qui va activer les récepteurs à l'EGF exprimés sur leurs membranes (O'Keeffe et al., 2009).

b) Signaux Serotoninergiques

Les récepteurs à la sérotonine (nommés 5-HT) sont aussi des récepteurs couplés aux protéines G (à l'exception de 5-HT₃) (Barnes and Sharp, 1999). En utilisant les ligands de ces récepteurs ainsi que des tests de prolifération cellulaire *in vivo*, il a été

démontré que 4 de ces récepteurs semblent impliqués dans la régulation de la neurogenèse adulte : 5-HT_{1A} , 5-HT_{1B} , 5-HT_{2A} et 5-HT_{2C} (Banasr et al., 2004). Au niveau fonctionnel, l'activation des récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{2C} *in vivo* augmente la prolifération dans la ZSV tandis que l'activation de 5-HT_{1B} la diminue (Banasr et al., 2004). Les effets de la sérotonine semblent être dépendant en partie de la stimulation de l'expression du BDNF (Mattson et al., 2004). Ainsi, les effets des signaux sérotoninergiques semblent être bénéfiques pour la prolifération cellulaire dans la ZSV.

c) Signaux glutamatergiques

Les signaux glutamatergiques mettent en jeu différents sous-types de récepteurs au glutamate ; les récepteurs ionotropiques NMDA et AMPA/kainate (Sommer and Seeburg, 1992) ainsi que les récepteurs métabotropiques (mGluRs) (Conn and Pin, 1997). En utilisant l'imagerie calcique ainsi que les profils électrophysiologiques sur coupes de cerveaux, l'équipe d'Angélique Bordey a découvert l'expression d'une mosaïque de récepteurs au glutamate chez les neuroblastes : AMPA, NMDA ainsi que mGluR5 (Platel et al., 2007) (Platel et al., 2008b) (Platel et al., 2010a). Cependant, l'expression des récepteurs au glutamate sur les CSN et progéniteurs nerveux est beaucoup moins évidente. Les cellules de type astrocytaire ne présentent aucun courant induit par le NMDA ou AMPA et aucune augmentation de calcium intracellulaire (Platel et al., 2010a). Les cellules de type astrocytaire semblent être la source principale de glutamate dans la ZSV car elles expriment le transporteur vésiculaire au glutamate VGLUT1, indispensable au relargage de glutamate dans le milieu (Platel et al., 2007) (Platel et al., 2010a). Le glutamate relargué a pour cible première les neuroblastes avoisinants (Platel et al., 2010a). Les souris déficientes pour l'expression de mGluR5 ou traitées avec des antagonistes de mGluR5 ont une prolifération fortement diminuée dans la ZSV (Di Giorgi Gerevini et al., 2004) (Di Giorgi-Gerevini et al., 2005).

d) Signaux GABAergiques

L'action du neurotransmetteur GABA est possible grâce à l'existence d'au moins trois types de récepteurs au GABA (Chebib and Johnston, 1999) : les récepteurs canaux

ioniques dont l'activation permet l'ouverture d'un canal chlore (Cl^-), GABA_AR et GABA_CR , et le récepteur couplé aux protéines G, le GABA_BR . Les récepteurs GABA_BR sont exprimés dans la ZSV tandis que l'expression des GABA_CR n'est pas encore décrite (Bolteus and Bordey, 2004). Quant aux GABA_AR , ils sont exprimés à la fois sur les neuroblastes et les cellules de type astrocytaire peuplant la ZSV, d'après les observations faites à partir d'imagerie au calcium et de techniques de « patch clamp » faites sur le rat nouveau-né et la souris (Nguyen et al., 2003) (Liu et al., 2005). A l'instar des récepteurs au glutamate, l'expression des récepteurs au GABA sur les progéniteurs nerveux n'est pas encore déterminée. Le GABA est un inhibiteur de la prolifération des astrocytes de la ZSV chez souris jeunes (30-40 jours) (Liu et al., 2005). Il exerce un contrôle négatif de la prolifération des neuroblastes chez les nouveaux nés murins (Nguyen et al., 2003). Ces études montrent une influence négative des signaux GABAergiques sur la prolifération cellulaire dans la ZSV, via une signalisation paracrine. La figure 13 illustre synthétiquement l'influence des signaux glutamatergiques et GABAergiques dans la ZSV.

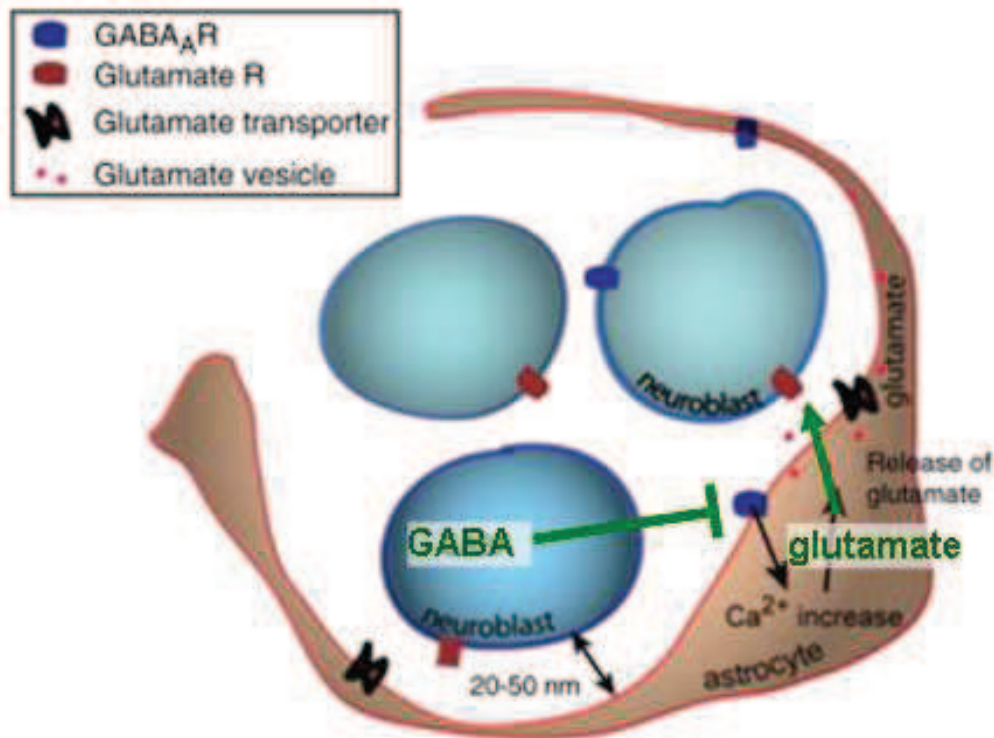


Figure 13 : Signaux glutamatergiques et GABAergiques dans la ZSV

Les neuroblastes produisent du GABA qui est relargué dans l'espace extracellulaire. Le GABA active les récepteurs exprimés sur les astrocytes. Sous l'influence de l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium, les astrocytes de la ZSV produisent du glutamate. Le glutamate produit va activer ses récepteurs présents sur les neuroblastes. Les flèches vertes présentes les effets principaux observés par ces deux neurotransmetteurs sur la prolifération dans la ZSV : GABA inhibe la prolifération des astrocytes, et le glutamate active la prolifération des neuroblastes. Schéma adapté de (Platel et al., 2010b).

4.2 Régulation de la balance quiescence/activation des CSN adultes

Après ce catalogue des principaux facteurs impliqués dans la régulation des phases précoces de la prolifération dans les niches neurogéniques adultes, nous allons maintenant nous intéresser plus spécifiquement à la régulation des CSN. En effet, un des principaux défis actuels pour l'application des CSN à des fins thérapeutiques est le recrutement des CSN quiescentes endogènes. Cela nécessite une plus large compréhension du cycle cellulaire particulier des CSN, des facteurs régulant leur auto-renouvellement ainsi que des signaux permettant de contrôler la balance entre leur quiescence et leur activation.

4.2.1 Quiescence et activation des cellules souches

Les cellules quiescentes peuvent intégrer ou réintégrer le cycle cellulaire en cas de stimuli par des facteurs de croissance par exemple. Cet état de quiescence est nécessaire dans le cerveau adulte à la fois pour éviter l'épuisement du stock de CSN avec l'âge et pourrait permettre de limiter l'accumulation de mutations dans les CSN pouvant conduire au cancer (Mira et al., 2010). La quiescence a d'abord été illustrée dans le système hématopoïétique par différentes approches *in vivo*. Lorsque des souris sont soumises à des agents anti-mitotiques, l'hématopoïèse est momentanément altérée voire stoppée mais on observe reprise progressive, ce qui suggère que certaines cellules, certainement des cellules souches quiescentes, ont résisté au traitement anti-mitotique car elles n'étaient pas en prolifération. D'autre part, la transplantation successive de cellules souches hématopoïétiques dans des animaux receveurs montre que ces cellules ont un potentiel d'autorenouvellement à long terme. En revanche, en utilisant des cellules souches hématopoïétiques qui ne peuvent pas entrer en quiescence car elles sont déficientes pour p21^{waf}, il a été montré que la production à long terme des cellules sanguines était réduite (Cheng et al., 2000). Ce résultat démontre que la quiescence des cellules souches est nécessaire au maintien de l'hématopoïèse à long terme. De nombreux tissus des mammifères adultes, dont l'intestin, la peau et le système sanguin, ont la capacité de se régénérer. Une étude récente propose qu'une raison primordiale de la réponse et

de la régénération rapide après stress dans ces tissus est la coexistence de cellules souches quiescentes et activées au sein du tissu (Li and Clevers, 2010). Ces cellules souches activées sont multipotentes, s'autorenouvellent avec un cycle cellulaire court, sont dérivées des cellules souches quiescentes, et se différencient en progéniteurs. Dans les régions neurogéniques adultes, la découverte de CSN quiescentes et de CSN activées s'est aussi faite grâce à l'étude de la régénération de la ZSV après traitements anti-mitotiques (Morshead et al., 1994) (Doetsch et al., 1999b). Les CSN activées de la ZSV sont éliminées par le traitement anti-mitotique et quelques heures après, les CSN quiescentes commencent à exprimer des marqueurs d'entrée en G1 comme mcm2 et « s'activent » en exprimant l'EGFR à leur membrane, permettant la régénération de la ZSV (Pastrana et al., 2009). Ainsi, on distingue les « CSN activées », exprimant l'EGFR, et donnant naissance à des neurosphères *in vitro* des « CSN quiescentes », n'exprimant pas l'EGFR et ne donnant pas de neurosphères *in vitro* (Doetsch et al., 2002) (Pastrana et al., 2009). Cette distinction existe aussi dans la ZSG, où les CSN quiescentes peuvent s'activer après traitement à l'AraC (Lugert et al., 2010).

4.2.3 Régulateurs du cycle cellulaire des CSN.

Plusieurs études ont montré que les régulateurs du cycle cellulaire sont impliqués dans la balance quiescence/activation des CSN. La régulation de la G1 est essentielle pour contrôler la prolifération dans la ZSV et la ZSG (Beukelaers et al., 2012). La cyclin dépendent kinase 6 (cdk6) contrôle la durée de la G1 pour réguler la balance entre prolifération et différenciation dans la ZSG et la ZSV adulte, mais son action semble spécifique des cellules de type C, et non des CSN (Beukelaers et al., 2011). En revanche, l'inhibiteur de progression en G1 p21waf est essentiel pour maintenir les CSN adultes dans un état de quiescence (Kippin et al., 2005). La délétion de p21waf entraîne d'ailleurs une augmentation de la prolifération des CSN menant à l'épuisement prématuré de leur stock (Kippin et al., 2005). La phosphatase et homologue de la tensine Pten, dont la mutation est associée à de nombreux cancers, est un gène suppresseur de tumeur de par l'action de la protéine phosphatase qu'il produit. La délétion de Pten favorise l'auto-renouvellement des CSN en modulant positivement la transition G0-G1 et l'entrée en G1 des CSN (Groszer et al., 2006). La délétion de Pten dans les CSN permet d'ailleurs

d'augmenter l'auto-renouvellement des CSN dans la ZSV sans signe d'épuisement du stock de cellules souches (Gregorian et al., 2009). Bmi-1, régulant les inhibiteurs du cycle cellulaire p16ink4 et p19arf, contrôle la prolifération et l'auto-renouvellement des CSN. Ainsi, Bmi-1 favorise l'auto-renouvellement des CSN chez les souris juvéniles (30 jours après naissance ou P30) et le développement cérébral en réprimant les voies de sénescence induites par p16ink4 et p19arf (Molofsky et al., 2005). Chez l'embryon et chez l'adulte, la répression de Bmi-1 par des sh-RNA réduit la prolifération et l'auto-renouvellement des CSN, mais étonnamment cet effet est possible grâce à l'activation d'un autre inhibiteur du cycle cellulaire, à savoir p21waf (Fasano et al., 2007). La répression de p53 favorise la prolifération des CSN et progéniteurs au bord du ventricule, ce qui suggère un rôle de p53 dans la maintenance de la quiescence des CSN (Gil-Perotin et al., 2006). Cependant aucune distinction n'est faite dans cette étude entre les CSN activées et les progéniteurs. Les homologues de p53, p63 et p73, semblent aussi réguler la prolifération des CSN. La protéine p73, en particulier, permet de maintenir le stock de CSN en favorisant l'auto-renouvellement, la prolifération et en inhibant l'entrée en sénescence des CSN chez l'embryon et l'adulte (Talos et al., 2010).

4.2.4 Modulateurs intrinsèques d'auto-renouvellement des CSN.

Pour que les CSN quiescentes puissent s'activer, la balance entre auto-renouvellement et différenciation doit être bien ajustée. Les modulateurs intracellulaires comme les facteurs de transcription ou les régulateurs épigénétiques permettent de stabiliser le profil d'expression génique d'une cellule. Ils sont essentiels au maintien de la balance entre l'auto-renouvellement et la différenciation. Le récepteur nucléaire *tailless* (Tlx) a été décrit comme un marqueur des CSN de la ZSG et de la ZSV (Shi et al., 2004, Liu et al., 2008). Il permet de maintenir les CSN dans un stade non différencié en recrutant des histones désacétylases (HDACs) vers des gènes cibles, comme p21waf (cip1/waf1) et Pten (Sun et al., 2007). Le facteur de transcription Sox2, fortement exprimé par les progéniteurs nerveux adultes, régule de nombreux gènes et forme des boucles de régulation avec d'autres voies comme Sonic hedgehog (Shh) et la voie du récepteur à l'EGF pour maintenir les CSN dans leur état de quiescence (Favaro et al., 2009) (Hu et al., 2010). FoxO3, membre de la famille des facteurs de transcription FoxO qui est associé avec la longévité, a été

impliqué récemment dans la maintenance du stock de CSN. Les souris KO FoxO3 (-/-) ont moins de CSN *in vivo* que les souris sauvages FoxO3 (+/+). Les CSN isolées des souris KO ont une capacité d'auto-renouvellement diminuée et ont des difficultés à se différencier en neurones. De plus FoxO3 semble préserver la quiescence, éviter la différenciation prématurée et contrôler le métabolisme oxygéné des CSN adultes (Renault et al., 2009). Une étude très récente a montré qu'un facteur de transcription nucléaire Gsx2, est exprimé dans le cerveau embryonnaire au niveau du LGE, origine supposée des CSN de la ZSV adulte et son expression dans le cerveau adulte se restreint à la région dorsale de la ZSV. Il semble être spécifique des régions neurogéniques et est exprimé dans les CSN activées et les cellules de type C. Des expériences de gain/perte de fonction ont montré que son expression était nécessaire à l'activation des CSN quiescentes et contrôlait ainsi la production en aval de sous-types de neurones dans les bulbes olfactifs (Lopez-Juarez et al., 2013).

4.2.5 Signaux de la niche régulant la balance quiescence/activation des CSN.

Comme nous l'avons vu précédemment, les CSN résident dans des niches neurogéniques complexes favorisant une riche interaction entre les cellules. Les signaux issus des cellules de la niche doivent jouer un rôle important dans la balance quiescence/activation des CSN.

a) Astrocytes

Les astrocytes peuplant les niches de la ZSG et de la ZSV libèrent des signaux moléculaires, comme sonic hedgehog (Shh), qui stimulent les CSN et leur entrée dans le cycle cellulaire pour permettre la génération de nouveaux neurones *in vivo* et *in vitro* (Jiao and Chen, 2008). Les astrocytes de la ZSG relarguent Wnt3 et les astrocytes de la ZSV produisent Wnt7a pour stimuler la prolifération des CSN (Kuwabara et al., 2009). En utilisant l'Axin2 comme gène rapporteur de l'activation de Wnt, la voie Wnt a été montrée comme étant active chez les CSN et cellules de type C (Adachi et al., 2007). Cependant, la sur-activation de la voie Wnt peut entraîner l'épuisement du stock de CSN dans la ZSV (Adachi et al., 2007) supposant une implication de la voie Wnt dans l'activation des CSN.

b) Cellules endothéliales

Les cellules endothéliales de la ZSV produisent du PEDF (pigment epithelium growth factor) pour contrôler la prolifération des CSN. Les CSN ont accès au PEDF car elles contactent les vaisseaux sanguins dans la niche (Tavazoie et al., 2008) (Shen et al., 2008). Le PEDF module le maintien de la quiescence des CSN par son interaction avec la voie Notch (Andreu-Agullo et al., 2009). La voie Notch est essentielle à la maintenance de la quiescence des CSN à la fois dans la ZSV et dans la ZSG (Chapouton et al., 2010). La balance entre la division symétrique et asymétrique des CSN peut être modulée par la régulation de l'activité transcriptionnelle de Notch par le PEDF (Andreu-Agullo et al., 2009). Les cellules endothéliales régulent aussi la quiescence des CSN en produisant des BMPs (bone morphogenetic proteins). Une étude a montré que la coculture de CSN et progéniteurs nerveux avec des cellules endothéliales active la voie BMP/Smad et réduit leur prolifération *in vitro* (Mathieu et al., 2008). La production de BMPs par les cellules endothéliales entraîne une activation de la transcription Pten dans les CSN de la ZSV, qui permet de les maintenir dans leur état de quiescence (Mathieu et al., 2008).

c) Neuroblastes

Dans la ZSV, GABA est produit par les neuroblastes et exerce une rétroaction négative sur la prolifération des cellules astrocytaires (comprenant les CSN), qui expriment les récepteurs au GABA (Liu et al., 2005). L'autorenouvellement des CSN est aussi contrôlé par l'activation des récepteurs GABA(A), via la phosphorylation de l'histone H2AX (Fernando et al., 2011). Dans l'hippocampe adulte, les CSN de la ZSG répondent à l'activation par le GABA via la sous unité gamma(2) des récepteurs GABA(A). La délétion conditionnelle de cette sous-unité gamma(2) entraîne une sortie de quiescence rapide des CSN de la ZSG et favorise leur division symétrique (Song et al., 2012). Ainsi, la voie de signalisation du GABAAR permet de maintenir les CSN en quiescence dans la ZSV et la ZSG.

Dans le tableau 3 sont recensés les principaux facteurs intracellulaires, extracellulaires et les neurotransmetteurs qui régulent les phases le plus précoces de la neurogenèse adulte, de l'auto-renouvellement des CSN à la prolifération des CSN activées et cellules de type C, en passant par l'étape d'activation des CSN.

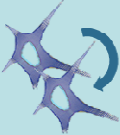
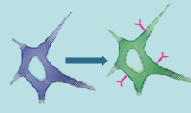
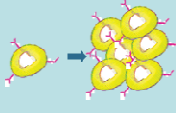
Signaux moléculaires	 Auto-renouvellement des CSN	 Activation des CSN	 Prolifération	Références
Rb/E2F			+	Yoshikawa, K. <i>et al.</i> 2000
Inhibiteurs Cdk P27KIP1, p19INK4d			-	Coksun, V. <i>et al.</i> 2001 Doetsch, F. <i>et al.</i> 2002 Zindy, F. <i>et al.</i> 1999
microRNA-124			-	Cheng, L.C. <i>et al.</i> 2009
p21	+	-		Kippin <i>et al.</i> , 2005
P-ten	-	-		Grzeser <i>et al.</i> , 2006 Mathieu, C. <i>et al.</i> 2008
Bmi-1	+			Molofsky <i>et al.</i> , 2005
p53		-		Gil Perotin <i>et al.</i> , 2006
p73	+	-		Ialos <i>et al.</i> 2010
Tlx		-		Liu <i>et al.</i> 2008
FoxO3	+			Renault <i>et al.</i> , 2009
H2AX	-			Fernando <i>et al.</i> , 2011
Gsx2		+		Lopez-Juarez <i>et al.</i> , 2013
FGF2			+	Mudo, G. <i>et al.</i> 2009 Wagner, J. P. <i>et al.</i> 1999
EGF			+	Jin, K., <i>et al.</i> 2003a Jin, K., <i>et al.</i> 2003b Kuhn, H. G., <i>et al.</i> 1997 Illiescu, I. <i>et al.</i> 2000 Burrows, R. C., <i>et al.</i> 1997 Doetsch, F. <i>et al.</i> 2002a
VEGF			+	Jin, K. <i>et al.</i> 2002
IGF-I			+	Hurtado-Chong, A., <i>et al.</i> 2009
IGF-II	-		+	Ziegler, A.N., <i>et al.</i> 2012
Sonic Hedgehog		+	+	Balordi, C. B., <i>et al.</i> 2007 Jiao and Chen, 2008
PDGF	+		+	Andreu-Agullo <i>et al.</i> , 2009
Notch	+		+	Chambers, F., <i>et al.</i> 2001 Andreu-Agullo <i>et al.</i> , 2009
Ephrin-B2			+	Conover, J.C., <i>et al.</i> 2000
Ephrin-A2			-	Holmberg, J., <i>et al.</i> 2005
Beta-catenine/Wnt		-	+	Adachi, K., <i>et al.</i> 2009
TGFβ1			-	Wachs, F.P., <i>et al.</i> 2006
BMP/Smad		-	-	Mathieu, C. <i>et al.</i> 2008
Dopamine			+	Hoglinger, G. U., <i>et al.</i> 2004 O'Keefe, G. C. <i>et al.</i> 2009 Yang, P., <i>et al.</i> 2008
GABA	-	-	-	Liu, X., <i>et al.</i> 2005 Nguyen, I., <i>et al.</i> 2003 Sosa <i>et al.</i> 2012 Fernando <i>et al.</i> , 2011
Glutamate			+	Giorgi-Gerevini, V., <i>et al.</i> 2005
Serotonin			+	Banser <i>et al.</i> 2004

Tableau 3 : Régulation des phases précoces de la neurogenèse adulte dans la ZSV

Récapitulatif des principaux régulateurs des phases précoces de la neurogenèse adulte par les facteurs intracellulaire (en bleu), les facteurs extra-cellulaires (en noir) et les neurotransmetteurs (en rouge).

4.4 Mécanismes et facteurs associés au vieillissement des niches neurogéniques

La neurogenèse décroît avec l'âge. Cependant, les mécanismes sont encore peu connus, et ce déclin pourrait provenir d'une perte de la fonctionnalité de la niche neurogénique, d'une induction de sénescence chez les CSN, de défauts dans les mécanismes d'interaction cellulaires, ou d'une combinaison de tous ces facteurs.

4.4.1 EGF et FGF2

La voie de signalisation du récepteur à l'EGF est primordiale dans la régulation de la neurogenèse adulte et les niveaux d'expression de l'EGFR sont réduits dans le cerveau âgé (Enwere et al., 2004). Les cellules de type C de souris âgées expriment moins de récepteurs à l'EGF à leur membrane, et la signalisation via l'EGFR semble diminuée chez les souris vieilles (Enwere et al., 2004) (Tropepe et al., 1997). L'injection intra-ventriculaire d'héparin binding EGF (HB-EGF), ainsi que FGF-2 dans les souris âgées (23-25 mois) permet de restaurer les niveaux de prolifération dans la ZSV observées chez les jeunes souris adultes (Jin et al., 2003a). Ces résultats suggèrent un défaut de signaux activant la voie de l'EGFR chez la souris âgée, et notamment du TGF- α ou de l'amphiregulin, produits par le plexus choroïde et ligands naturels du récepteur à l'EGF.

4.4.2 Télomérase

La télomérase est une reverse transcriptase dont l'activité enzymatique empêche le raccourcissement des télomères dû à la division cellulaire. Une augmentation de l'activité télomérase dans des cellules en culture permet d'empêcher leur entrée en sénescence (Bodnar et al., 1998). La télomérase est généralement absente du cerveau adulte, mais elle est détectable dans la ZSV et les BO (Caporaso et al., 2003). Chez les souris déficientes pour la télomérase, on observe une réduction de la prolifération dans la ZSV *in vivo*, et de la capacité à former des neurosphères *in vitro* (Ferron et al., 2004). De façon intéressante, le rétablissement de l'expression de la télomérase dans les souris déficientes pour la télomérase permet de rétablir la

prolifération dans la ZSV et les problèmes olfactifs engendrés (Jaskelioff et al., 2011).

4.4.3 Modifications du cycle cellulaire des CSN au cours du vieillissement

a) Senescence et dérégulation du cycle cellulaire des CSN au cours du vieillissement

L'expression des régulateurs positifs du cycle cellulaire comme la cycline D1 décroît avec l'âge (Kohman et al., 2011). La durée du cycle cellulaire ne semble pas altérée par le vieillissement, seule la proportion de cellules proliférantes varie (Olariu et al., 2007). De façon surprenante, dans la ZSV de souris âgées, un nombre plus faible de cellules se divisent, mais les CSNs et/ou progéniteurs semblent programmés pour un nombre plus important de divisions (Stoll et al., 2011). L'expression des inhibiteurs de progression en G1 p16^{INK4} et p19^{Arf}, impliqués dans la senescence cellulaire (Krishnamurthy et al., 2004), est augmentée dans la ZSV de souris âgées (Molofsky et al., 2006) (Molofsky et al., 2005). La délétion de p16^{INK4} favorise la prolifération des CSN et la neurogenèse dans la ZSV de souris âgées, mais pas dans la ZSG (Molofsky et al., 2006). L'expression de p21^{waf} augmente avec le vieillissement dans le cerveau (Legrier et al., 2001), les souris déficientes pour p21 présentent un épuisement prématuré de la prolifération dans la ZSV *in vitro* (Kippin et al., 2005)

b) Entrée en quiescence des CSN avec le vieillissement

Une des hypothèses décrites récemment pour expliquer le vieillissement des niches neurogéniques est une entrée progressive en quiescence des CSN avec l'âge. Dans le cerveau âgé, l'utilisation de souris transgéniques Hes5::GFP a permis de montrer que la voie de signalisation Notch entraîne progressivement les cellules souches dans un état de quiescence dans la ZSG (Lugert et al., 2010). L'entrée en cycle peut être rétablie par des stimuli comme l'exercice physique qui active les cellules souches quiescentes dans le cerveau adulte ou les crises d'épilepsie qui permettent une expansion du stock de CSN (Lugert et al., 2010). Ces stimuli permettent de

« rajeunir » le cerveau âgé en stimulant la neurogenèse. Bouab et coll. ont montré que la neurogenèse était déjà fortement diminuée à l' « âge moyen » (12 mois chez la souris) alors que le stock de cellules souches n'était pas affecté, ni la capacité des progéniteurs nerveux à former des neurosphère *in vitro* (Bouab et al., 2011). Les auteurs attribuent ces changements majeurs à une entrée en quiescence progressive des CSN, sans y associer de mécanismes particulier. Ainsi, la compréhension des facteurs régulant la balance quiescence/prolifération des CSN adultes a non seulement une importance capitale dans la meilleure caractérisation des CSN adultes en vue de leur application thérapeutique, mais semble être aussi indispensable à l'élucidation des phénomènes entraînant l'épuisement progressif de la neurogenèse au cours du vieillissement.

OBJECTIFS

Les cellules souches neurales soulèvent de plus en plus d'intérêts pour leur potentiel thérapeutique. Afin d'explorer la fonction et la régulation des CSN, les protocoles expérimentaux doivent permettre de distinguer, de façon fiable, les cellules souches de leur descendance. En raison de l'absence de marqueur spécifique de CSN ainsi que d'un phénotype morphologique distinct, les CSN ont été généralement définies et caractérisées par leur capacité à former des neurosphères *in vitro*. Cependant, la diversité des protocoles a amené à des résultats contradictoires entre les différentes études et remet en cause cette approche expérimentale. En effet, la simple variation de la densité cellulaire lors de l'ensemencement ou l'agrégation des cellules au cours de la culture fait varier la clonalité, censé être un révélateur de la quantité de CSN *in vivo* (Pastrana et al., 2011). Les techniques récentes d'isolation des différentes populations neurogéniques par FACS ont montré que les CSN activées ainsi que les cellules de type C forment des neurosphères *in vitro* alors que les CSN quiescentes, elles, ne forment pas de neurosphères (Pastrana et al., 2009). Ainsi, la simple supposition que chaque neurosphère est issue d'une unique CSN est fausse. Il devient nécessaire de distinguer avec plus de précision les différents types cellulaires peuplant les niches neurogéniques pour étudier leur comportement *in vitro* en *in vivo*.

Jusqu'ici des études ont réussi à purifier des populations enrichies en CSN, mais sans distinguer les CSN quiescentes des CSN activées (Capela and Temple, 2002) (Beckervordersandforth et al., 2010), alors que d'autres études ont réussi à distinguer les CSN activées des cellules de type C, mais sans purifier une population enrichie en CSN quiescentes (Pastrana et al., 2009). L'un des objectifs de ce travail de thèse a été de mettre au point une technique optimisée de purification des populations neurogéniques du cerveau adulte par cytométrie en flux, afin de mieux caractériser les CSN et leur cellules filles *in vivo* et *in vitro*. Le but était d'identifier précisément chaque population neurogénique peuplant la ZSV et notamment de distinguer les CSN quiescentes des CSN activées et les CSN activées des cellules de type C.

La stimulation endogène des CSN quiescentes peut permettre leur application à des fins thérapeutiques. Afin de mieux caractériser les facteurs favorisant l'entrée en cycle des CSN quiescentes, nous avons utilisé l'irradiation du cerveau à dose modérée. En effet, pour des doses modérées d'irradiation (2-5Gy), il a été observé une mort des cellules en prolifération, suivie par une reprise progressive de la neurogenèse (Hopewell and Cavanagh, 1972) (Tada et al., 1999) (Tada et al., 2000) qui suppose une entrée en cycle des CSN. L'irradiation du cerveau constitue un puissant modèle de « hit and run » qui nous a permis de caractériser les facteurs responsables des phases précoces de la reprise de la neurogenèse après irradiation. Ces facteurs pourraient notamment être cruciaux pour le contrôle de la balance quiescence/activation des CSN.

Un autre aspect primordial pour mieux comprendre la neurogenèse adulte est de mieux caractériser l'évolution des niches neurogéniques au cours du vieillissement. Le vieillissement physiologique est associé à une réduction progressive des cellules en prolifération dans la ZSG et la ZSV (Enwere et al., 2004) (Tropepe et al., 1997) (Jessberger and Gage, 2008). L'optimisation de la caractérisation des populations neurogéniques peuplant la ZSV par FACS nous a permis, en comparant les niches neurogéniques de souris jeunes aux niches neurogéniques de souris âgées, de déterminer les facteurs responsables du déclin de la neurogenèse lors du vieillissement.

Ces différents objectifs ont pour but une meilleure compréhension des facteurs impliqués dans la prolifération des CSN chez l'adulte en conditions normales, après irradiation ainsi que lors du vieillissement. Les résultats obtenus pourraient contribuer au développement de nouveaux traitements pour différentes pathologies du système nerveux central.

RESULTATS

ARTICLE 1 :

Identification of factors involved in neurogenesis recovery after irradiation of the adult mouse subventricular zone: a preliminary study.

François Chevalier*, Alexandra Chicheportiche*, Mathieu Daynac, Jordane Depagne, Pascale Bertrand, François D. Boussin and Marc-André Mouthon.

* Premiers auteurs associés

Publié dans **Proteomics – Human Diseases and Protein Functions** (Book chapter)
02/2012

Cette première étude a été publiée Février 2012 comme un chapitre du livre **Proteomics – Human Diseases and Protein Functions**. L'exposition du cerveau aux radiations ionisantes entraîne la mort des cellules en prolifération dans la ZSV (Shinohara et al., 1997). Pour de fortes doses d'irradiation, la neurogenèse est bloquée à long terme (Tada et al., 1999) mais l'exposition à des doses plus faibles permet une reprise de la neurogenèse. Les cellules en prolifération commencent à réapparaître 3 jours après exposition et atteignent un maximum après 7 jours (Tada et al., 1999) (Hopewell and Cavanagh, 1972). Ainsi, nous avons mis en place un modèle d'irradiation faible dose (2Gy) du cerveau adulte de jeunes souris adultes C57Bl6 (2-3 mois) afin d'étudier les facteurs impliqués dans la reprise de la neurogenèse. Lors de cette reprise de la neurogenèse, nous avons remarqué deux étapes importantes :

- 72 h après irradiation :
 - On observe une forte diminution de l'incorporation de BrdU dans la SVZ, synonyme d'une disparition quasi-totale des cellules en prolifération
 - Alors que les cellules de type B1, les astrocytes et les cellules épendymaires survivent, la grande majorité des cellules de type C et des cellules de type A n'ont pas survécu à l'irradiation.
 - Les rares cellules BrdU+ 72h après irradiation expriment en grande majorité le marqueur de CSN GFAP, suggérant que les CSN rentrent en prolifération.
- 7 jours après irradiation :
 - On observe un plus grand nombre de cellules BrdU+ dans la SVZ qu'avant irradiation.
 - La majorité de ces cellules BrdU+ exprime le marqueur de neuroblastes PSA-NCAM, montrant que la neurogenèse a repris efficacement.

A l'aide d'une analyse protéomique par gel d'électrophorèse en 2D combinée avec une analyse par spectrométrie de masse, nous avons analysé les protéines de la ZSV qui sont altérées 72h et 7J après une irradiation 2Gy.

- Sur 871 spots observés, 32 spots sont modifiés après irradiation, et 5 spots sont spécifiquement modifiés 3 jours après irradiation, et 16 spots 7 jours après irradiation.
- L'analyse a dévoilé que les protéines dont l'expression est modifiée avec l'irradiation occupent des fonctions cellulaires majeures comme la production d'énergie, la maintenance du cytosquelette et le trafic vésiculaire.
- 20% des protéines identifiées sont impliquées dans le métabolisme oxydatif

Ces modifications protéiques qui sont associées à la prolifération des cellules souches neurales 3 jours après irradiation et des neuroblastes 7 jours après irradiation sont des premiers résultats prometteurs pour la compréhension des voies cellulaires impliquées dans la prolifération des CSN après irradiation.

Identification of Factors Involved in Neurogenesis Recovery After Irradiation of the Adult Mouse Subventricular Zone: A Preliminary Study

François Chevalier^{1*}, Alexandra Chicheportiche^{2,3,4,5*},
Mathieu Daynac^{2,3,4,5}, Jordane Depagne¹, Pascale Bertrand¹,
François D. Boussin^{2,3,4,5} and Marc-André Mouthon^{2,3,4,5}

¹CEA DSV iRCM, Plateforme de Protéomique, F-92265 Fontenay-aux-Roses

²CEA DSV iRCM SCSR, Laboratoire de Radiopathologie, F-92265 Fontenay-aux-Roses

³INSERM, U967, F-92265 Fontenay-aux-Roses

⁴Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, UMR 967, F-92265 Fontenay-aux-Roses

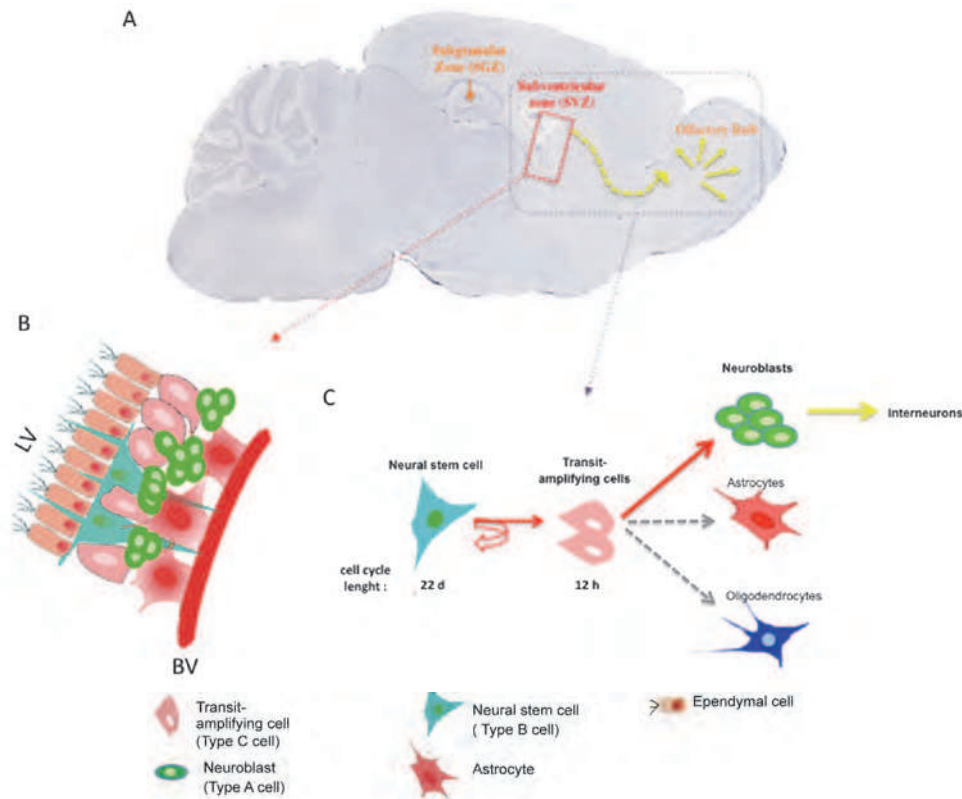
⁵Université Paris Sud, UMR 967, F-92265 Fontenay-aux-Roses,
Institut de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire,
Fontenay-aux-Roses
France

1. Introduction

Neurogenesis insures the production of functional neurons throughout life and occurs in two narrow regions of the adult mammalian brain, the subventricular zone (SVZ) lining the lateral ventricles and the subgranular zone in the hippocampus (Alvarez-Buylla&Lim,2004). The adult SVZ, which is separated from the lateral ventricle by a layer of epithelial cells known as ependymal cell, contains three main populations of neural progenitors: neural stem cells (NSCs), transit-amplifying cells (TAPs) and neuroblasts. NSCs are undifferentiated cells generally characterized by their functional capacities to both self-renew and to generate a large number of differentiated progeny cells (Song, et al.,2011). Adult NSCs have an astrocyte-like phenotype (type B cells) and represent only 0.2-0.4 % of the SVZ cells, they are relatively quiescent and divide very slowly *in vivo* with a cell cycle length of 14 days (Morshead, et al.,1994). These cells are the precursors of rapidly dividing TAPs, or type C cells, which have the capacity to differentiate into neuroblasts (type A). Neuroblasts are organized as migratory chains along the rostral migratory stream (RMS) and integrate the Olfactory bulb (OB) to become interneurons (Fig. 1).

The highly organised cytoarchitecture of the SVZ constitutes a niche for NSCs (Ihrie&Alvarez-Buylla, 2011). Cells localized in this specific microenvironment secrete a variety of factors involved in NSC proliferation, migration and/or differentiation

* Contributed equally to this work



(A) In adult mouse brain, neurons are continuously produced in two restricted regions: the subgranular zone (SGZ) of the dentate gyrus in the hippocampus and the subventricular zone (SVZ) lining the lateral ventricles (LV). The former produces neurons that functionally integrate into the granular cell layer of the hippocampus, whereas the SVZ produces neuroblasts, which migrate along the rostral migratory stream (RMS) to integrate the olfactory bulbs (OB) and differentiate into interneurons.

(B) The SVZ is an highly organized neurogenic area which contains three cell types of neural cells: neural stem cells (NSCs), transit-amplifying progenitors (TAPs) and neuroblasts. Ependymal cells that contact the NSCs are organized as a single layer of epithelial cells separating the SVZ from the ventricles.

(C) NSCs are defined as slow dividing cells having capacities to self-renew and to generate multiple cell types (neurons, astrocytes and oligodendrocytes). NSCs give rise to highly proliferating TAPs, which differentiate mostly in neuroblasts. NSCs are also able to produce oligodendrocytes and astrocytes according to development stages, in response to brain injury or *in vitro* conditions. The length of the cell cycle for NSCs and TAPs lasts 22 days and 12 h, respectively (Doetsch, et al.,1999, Morshead, et al.,1994). BV (blood vessel).

Fig. 1. Neurogenesis in the adult mouse brain

(Doetsch,2003). For example, GABA released from neuroblasts provides a feedback mechanism to control proliferation of NSCs in the SVZ (Liu, et al.,2005). Bone morphogenetic proteins signalling can direct neural progenitors to glial fate in the adult brain (Lim, et al.,2000), whereas the secretion by ependymal cells of Noggin, a polypeptide

antagonist of bone morphogenetic proteins, antagonizes Bone morphogenetic protein signalling and stimulates neurogenesis (Lim, et al.,2000). Brain endothelial cells are thought to be crucial for the NSC niche because they lie in close proximity to NSCs (Tavazoie, et al.,2008), where they probably regulate self-renewal of NSCs and their differentiation into neurons (Ramirez-Castillejo, et al.,2006). Brain endothelial cells may also balance proliferation/quiescence of NSCs by secreting Bone morphogenetic proteins (Mathieu, et al.,2008).

A number of studies indicate that brain injury can induced SVZ cells to migrate towards non-OB areas especially towards lesions and participate in neuronal and glial repair (Alonso,1999, Cayre, et al.,2006, Goings, et al.,2004, Jankovski, et al.,1998, Macas, et al.,2006, Picard-Riera, et al.,2002, Yamashita, et al.,2006). Adult NSCs may therefore promise hopes in the repair of damaged central nervous system (Dubois-Dalcq,2005).

Adult NSCs survive anti-mitotic cytosine arabinoside treatment *in vivo* unlike actively dividing TAPs and neuroblasts, which rapidly disappear. This assay has been used by Doetsch et al. to demonstrate that quiescent NSCs are able regenerate to the neurogenic SVZ niches (Doetsch, et al.,1999). Exposition of the brain to ionizing radiation induces apoptosis of proliferating cells in the SVZ (Shinohara, et al.,1997). For high doses of irradiation an incomplete repopulation of the SVZ occurred and neurogenesis is collapsed for long term (Tada, et al., 1999).

However, exposition to low doses allows SVZ to be replenished. A recovery of proliferating cells is observed starting 3 days after radiation and peaking at day 7 (Hopewell and Cavanagh 1972; Tada, et al.,1999).

In light of the recovery capacity of SVZ, we developed a model of low dose irradiation (2 Gy) of adult mouse brain, which provokes a transient collapse of neurogenesis followed by a rapid recovery of the SVZ. The repopulation of the SVZ was most probably due to the stimulation of relatively quiescent NSCs and their proliferation (Morshead, et al.,1994, Pastrana, et al.,2009).

Seek for factors involved in the stimulation of neurogenesis and production of new neurons remains a challenging task. We assume that our *in vivo* irradiation model will be helpful to identify proteins coinciding with SVZ reconstitution, i.e. those involved in NSC proliferation.

Only few global proteomic analyses on rodent brains have been reported, attempting to identify proteins that are involved in brain injury such as middle cerebral artery occlusion ischemia (Sung, et al. 2010), or to gain further insight into the molecular mechanisms of neurodegenerative diseases (Broadwater, et al., Castegna, et al.,2002). Others proteomic studies aimed to identify crucial proteins by comparison between different brain developmental stages and during brain aging (Shoemaker, et al. 2010, Yang, et al.,2008). Therefore, we performed a global proteomic analysis based on 2 dimensional-gels and identification by mass spectroscopy in our SVZ reconstitution model. We decided to work with proteins extracted from SVZ, instead of cells isolated using a specific marker. Indeed, with all SVZ extract, including NSC, progenitor cells and the SVZ extracellular matrix, it was possible to search for protein and secreted factors potentially involved in NSC proliferation, migration and/or differentiation.

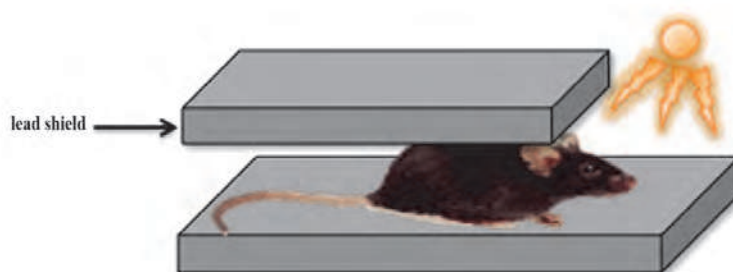
In this preliminary study, an accurate analysis of 2D-gel revealed that several proteins from SVZ appeared as modulated following brain radiation. Important issues of this study are the identification of candidates possibly involved in the stimulation of quiescent NSCs.

2. Material and methods

2.1 Mouse irradiation

We used eight-week old male C57BL/6J mice (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France). All experimental procedures complied with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and European Union guidelines.

Mice were irradiated with a medical Alcyon irradiator (γ -rays ^{60}Co) (Fig. 2). Prior to radiation, mice were anesthetized with ketamine (75 mg/kg, Merial, Lyon, France) and medetomidine (1 mg/kg, Pfizer, Paris, France) by intraperitoneal (i.p.) route. Immobilized mice were placed under a lead shield in order to expose the head and to protect the rest of the body. A total dose of 2 Gy was delivered with a dose rate of 1 Gy/mn. After exposure, mice were woken up by i.p. injection of antipamezole (1 mg/kg, Pfizer, Paris, France).



Irradiation was performed with a medical irradiator (Alcyon, ^{60}Co source). Irradiation window was focused at the level of the head of the anesthetized mouse. The rest of the body was protected by a lead shield.

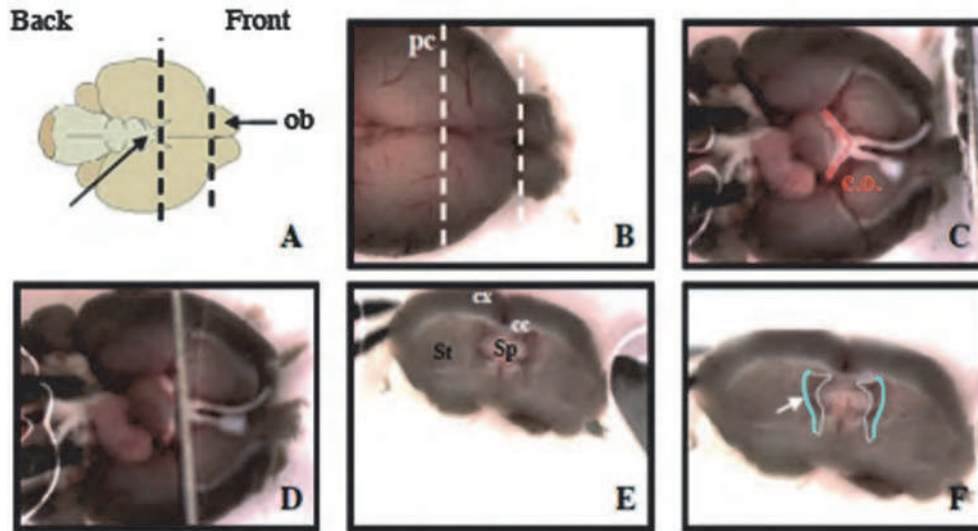
Fig. 2. Schematic representation of brain irradiation

2.2 Micro-dissection of the brain

At different time points after radiation, mice were euthanatized and SVZ and striatum (STR) were micro-dissected (Fig. 3). The micro-dissection method used to isolate SVZ is very tricky since SVZ is a very tiny part of brain tissue. Briefly, skull was cut with scissors at the midline and carefully removed with forceps. The brain was transferred into a Petri dish containing phosphate buffered saline and 6g/L of glucose. OBs were removed and a coronal cut was made at the optical chiasma. Then, under a stereomicroscope, septum was removed from the fore part of the brain with small forceps. Lateral walls of ventricle, containing the SVZ, were microdissected using small forceps and cleared out of contaminating corpus callosum and STR. A piece of STR adjacent to SVZ was taken. Tissue pieces were immediately frozen in liquid nitrogen.

2.3 Protein extraction

Proteins were extracted from SVZ and STR of control (Ctr) and irradiated mice. Tissues were homogenized in buffer containing 9M urea, 4% CHAPS, 0.05% Triton X100, 65 mM DTT and a protease inhibitor cocktail (Roche) with a small Teflon pestle and cell debris were removed by ultra-centrifugation at 100 000g for 1 hour (TL100, Beckman). The protein



(A) A schematic representation of ventral face of the brain with the two cuts: one at the front just behind the OB and one at the level of optic chiasma. (B) Representative photographs of dorsal face and (C, D) ventral face of the mouse brain. (E, F) Coronal views of brain slices after cuts. (E) Lateral ventricles are visible from each part the septum. The ventricular walls to be dissected out containing the SVZ are indicated by arrow and light blue lines.

Cx: cortex; cc: corpus callosum; St: striatum; Sp: septum.

Fig. 3. Process for micro-dissection of the SVZ

content was estimated in the supernatant using the Bradford assay. To limit variability, tissue pieces from mice with the same treatment were mixed together in proteomic sample buffer.

2.4 Two-dimensional electrophoresis

Two-dimensional electrophoresis was performed with at least 5 technical replicates. Briefly, precast 18 cm strips, pH range 3-10 NL (GE), were rehydrated in the presence of 100 µg of protein extract. Isoelectric focusing was carried out using a Protean IEF Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) isoelectric focusing system until 80 KV h-1. The strips were then incubated in the first equilibration solution (50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M urea, 30% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS) with 130 mM DTT and then in the second equilibration solution (50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M urea, 30% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS) with 130 mM iodoacetamide. Strips were then embedded using 1% (w/v) low-melting agarose on the top of the acrylamide gel. SDS-PAGE was carried out on a 12% acrylamide SDS-polyacrylamide gel, using the Dodeca Cell electrophoresis unit (Bio-Rad).

Gels were stained with Sypro-Ruby and scanned to images, which were digitized with a Typhoon 9400 fluorescent scanner (Typhoon 9400 GE) using the 532 nm excitation laser and the 610BP emission filter. Image were acquired at a 100 µm resolution with a 550 voltage applied to the photomultiplier tube.

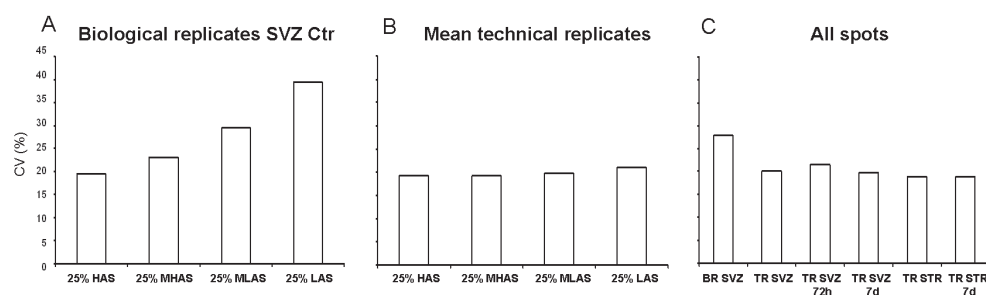
2.5 Image analysis

Images from stained gels were analyzed using the SameSpots software v4.1 (Non-linear Dynamics, UK). All pictures were first aligned and gel replicates were then grouped to create a global analysis with all conditions. Spots of each sample were compared between control and irradiated conditions. A multivariate statistic analysis was performed using the statistic mode of the SameSpots software v4.1 (Non-linear Dynamics, UK). Spots with significant differences between control and irradiated cells (Anova t-test $p < 0.05$) were first extracted. Then, only spots with a P value < 0.05 and a power > 0.8 were finally selected. Spots of interest were selected for subsequent protein identification by mass spectrometry analysis.

2.6 Two-D gel reproducibility

Using gel-based proteomics analysis, it is important to estimate the contribution of biological and technical variations. We assessed the degree of biological variation inherent to the 2-DE process. SVZ were extracted separately from 9 mice. For each mouse, about 150 μ g proteins were extracted in buffer containing 9M urea, 4% CHAPS, 0.05% Triton X100, 65 mM DTT and a protease inhibitor cocktail (Roche) then were used to produce a corresponding 2D-gel. Protein spot volume was determined for all spots matched in an experimental set using the SameSpots software packages with default settings, as used for all the study. Coefficients of variation (CV) were calculated for each protein sample, or as a function of spot intensity. CV was calculated as a percentage of standard variation as related to mean: $(SD/\text{mean}) \times 100$ (Anderson, et al., 1985).

The SVZ of each animal were used to perform a single 2-D gel. All spots of the corresponding 9 gels were compared as biological replicates (Fig. 4 A).



(A) coefficient of variation of SVZ Ctr samples between 9 biological replicates, as a function of spot intensity (HAS: high abundant spots; MHAS: medium high abundant spots; MLAS: medium low abundant spots; LAS: low abundant spots).

(B) coefficient of variation of all technical replicates, as a function of spot intensity.

(C) comparison between coefficients of variation of biological replicates (BR) and technical replicates (TR) of SVZ and STR samples.

Fig. 4. Biological and technical variability of proteomes as measured by 2-D gel electrophoresis.

Coefficient of variation grew up from 20% for high abundant spots to about 40% for low abundant spots. As a comparison, the degree of technical variation inherent to the 2-DE process was estimated for each SVZ and STR samples. Biological samples corresponding to the same treatment were mixed and the resulting protein samples were used to perform

technical 2-D gel replicates (Fig. 4 B). In this case, a constant coefficient of variation was observed (about 20%) whatever spot abundance (Fig. 4 B) and sample treatment (Fig. 4 C). This analysis of 2-D gel reproducibility clearly showed the advantage to perform technical replicates with mixed biological samples.

2.7 MALDI-TOF MS analysis

Spots were excised from preparative two-dimensional electrophoresis gels by hand, and processed using a Packard Multiprobe II liquid-handling robot (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). After washing successively with water, 25 mM ammonium bicarbonate, acetonitrile / 25 mM ammonium bicarbonate (1:1, v/v) and acetonitrile, gel fragments were dried at 37°C. Protein digestion was carried out at 37°C for 5 hours following addition of 0.125 µg trypsin (sequencing grade, modified, Promega, Charbonnières, France), and resulting fragments were extracted twice with 50 µL acetonitrile / water (1:1, v/v) containing 0.1 % trifluoroacetic acid for 15 min. Pooled supernatants were concentrated with a speedvac to a final volume of 20 µL. Peptides were simultaneously desalted and concentrated with C18 Zip-Tip micro-columns to a final volume of 3 µL, an aliquot of each sample was mixed (1/1) with the alpha-cyano-4- hydroxycinnamic acid matrix at half saturation in acetonitrile/water (1:1, v/v) and the mixture was immediately spotted on the MALDI target by the Multiprobe II robot. Mass spectra were recorded in the reflector mode on a UltraFlex II MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Automatic annotation of monoisotopic masses was performed using Bruker's SNAPTM procedure. The MASCOT search engine software (Matrix Science, London, UK) was used to search the NCBI nr database.

The following parameters were used: mass tolerance of 30 to 100 ppm, a minimum of five peptides matching to the protein, carbamidomethylation of cysteine as fixed modification, oxidation of methionine as variable modification, and one missed cleavage allowed.

2.8 Nano LC MS analysis

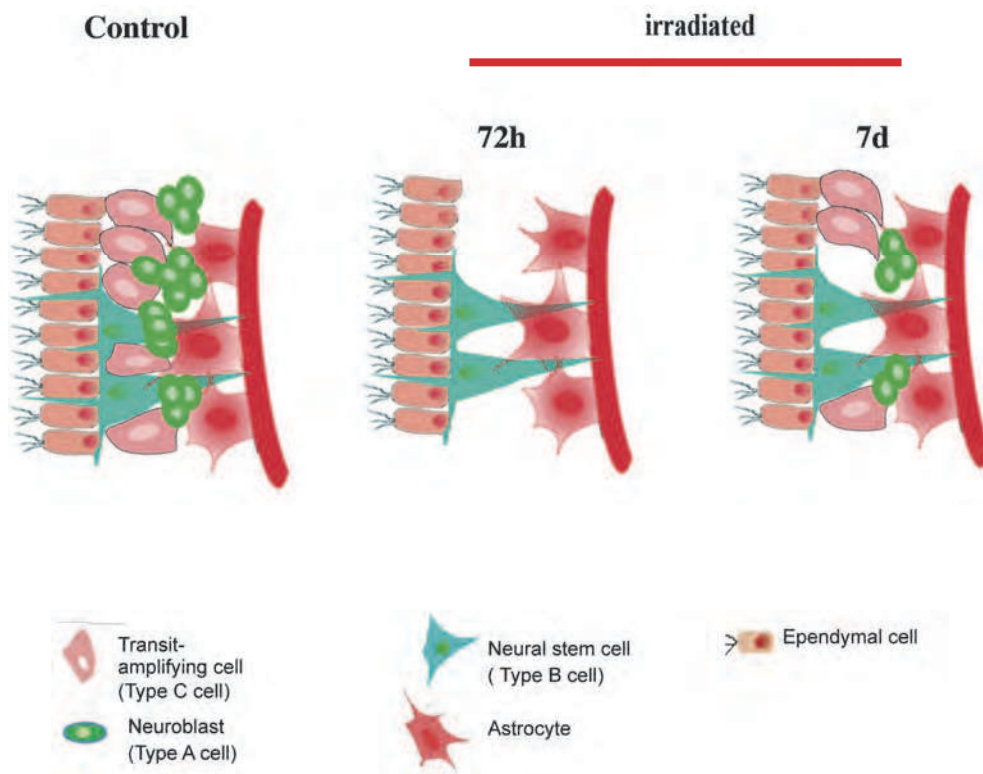
When low abundant spots could not be identified by PMF, LC-MS/MS analysis was conducted. Stained protein spots were excised manually, washed, digested with trypsin and extracted using formic acid. Protein digests were analysed using an ion trap mass spectrometer (Esquire HCT plus; Bruker, Billerica, MA, USA) coupled to a nano-chromatography system (HPLC 1200, Agilent, Santa Clara, CA, USA) interfaced with an HPLC-Chip system (Chip Cube, Agilent). MS/MS data were searched against NCBI (National center for Biotechnology information) and MSDB databases using Mascot software.

3. Results and discussion

3.1 Regeneration of the SVZ after radiation

We have developed a model of SVZ reconstitution after low dose irradiation (2 Gy) of adult mouse brain. Radiation exposure provoked a transient collapse of neurogenesis followed by a rapid recovery of the SVZ (Fig. 5).

Cell proliferation was assessed in the SVZ by injection with the thymidine analog 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU). We observed a sharp decrease in BrdU incorporation 72h after radiation, however, BrdU labelling subsequently recovered within 7 days after exposure (Fig. 6A). BrdU positive cells were scarce 72h after irradiation but most of them expressed

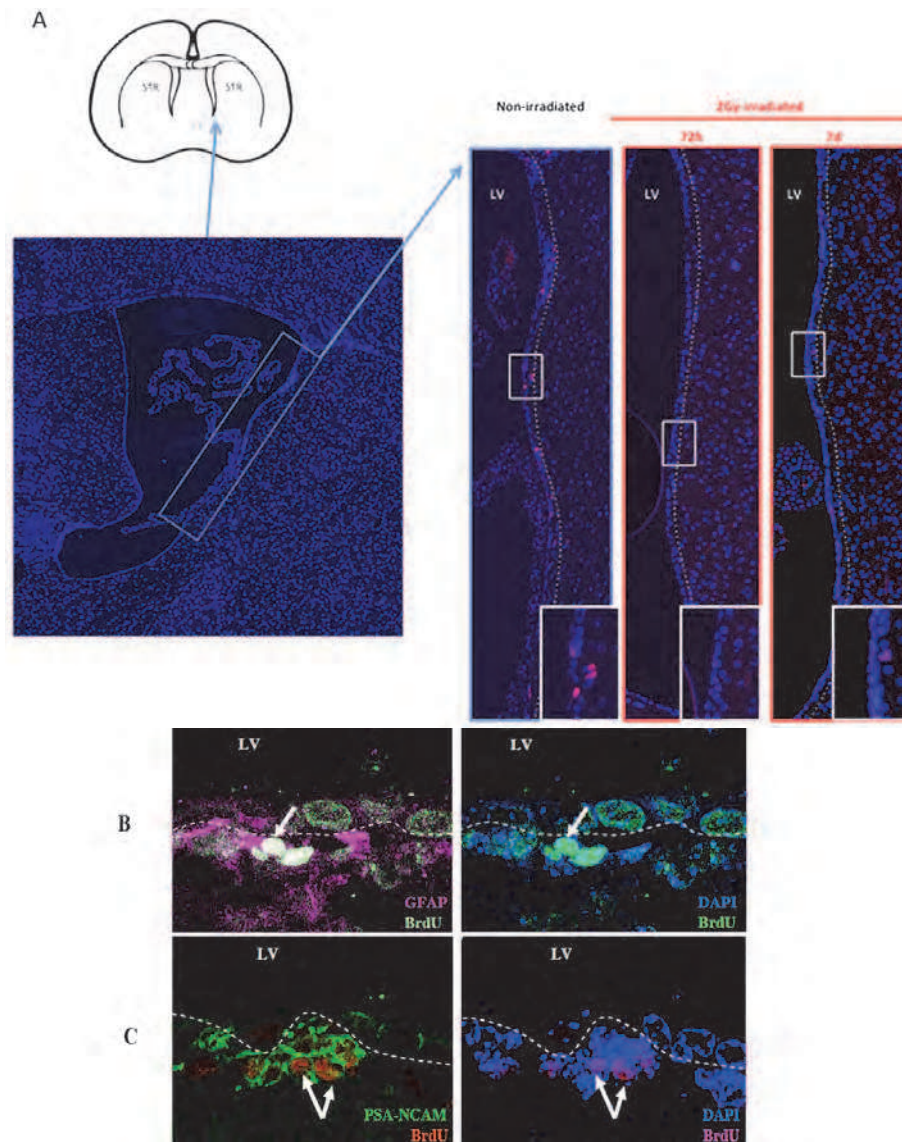


Radiation exposure of mice at 2Gy provoked a transient disappearance of progenitors of the subventricular zone (SVZ) such as transit-amplifying cells (Type C cell) and neuroblasts (Type A cell) at 72 hours. Four days later, those cells had almost completely replenished the SVZ.

Fig. 5. Schematic representation of SVZ reconstitution model after adult mouse brain irradiation.

Glial Fibrillary acidic protein (GFAP), a marker for NSCs, suggesting that quiescent NSCs are activated to re-enter cell cycle. Seven days after radiation, more numerous BrdU positive cells were observed and expressed the neuroblast marker PSA-NCAM arguing that neurogenesis recovered (Fig. 6B).

On the basis of these data and with the aim of finding proteins, such as growth factors secreted in the microenvironment involved in regeneration of the cells of the SVZ after radiation, we extracted proteins of non-irradiated SVZ and 2 Gy-irradiated SVZ at 3 and 7 days after exposure.



Mice were injected with BrdU 3 hours before sacrifice to label proliferating cells in control mice and after 2Gy-irradiation. Brain slices were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). (A) BrdU positive cells almost completely disappeared 72h post irradiation then they subsequently recovered in the SVZ niches. (B) 72 hours post-irradiation, some GFAP positive cells (pink), corresponding to candidate NSCs, have incorporated BrdU positive (green). At that time after irradiation, essentially NSCs proliferated in the SVZ niche. This result might underlie an activation of relatively quiescent NSCs 72h after irradiation. (C) 7 days after irradiation, the SVZ regeneration is evidenced by numerous neuroblasts PSA-NCAM positive (green) and BrdU positive (red) in the SVZ.

Fig. 6. Regeneration of the SVZ after irradiation

3.2 Proteomic strategy

We combined 2D-gel electrophoresis and MS analyses of SVZ samples to determine proteins that are altered following radiation in adult neurogenic niches in comparison to a non-neurogenic brain region, i.e. STR. Protein samples were separated using two-dimensional electrophoresis in 3-10 non-linear pH gradient strips and 12% acrylamide gels.

SVZ samples obtained from irradiated mice at 3 and 7 days after radiation were compared with SVZ samples from non-irradiated control mice (Fig. 7). Along with micro-dissection procedures, SVZ can be contaminated with STR. For that reason and because the striatum is not a neurogenic zone, non-irradiated and 7 days-irradiated striatum samples were also taken.

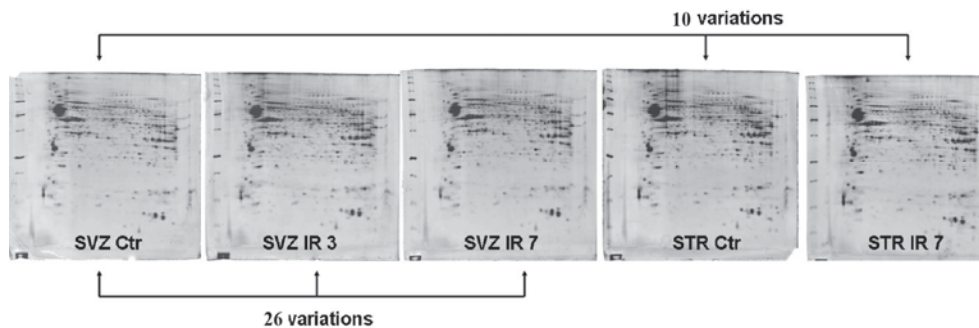


Fig. 7. Proteomic strategy of SVZ and STR samples comparison with no radiation (Ctr) and 3 days (IR 3) or 7 days (IR 7) after radiation.

3.3 Proteomic map analysis

As it can be observed in Fig. 7, pictures corresponding to the different samples analysed were very close and only minor differences can be observed, using a dedicated image analysis software.

From the 871 spots observed, a total of 36 spots were significantly modified for all the comparisons (Fig. 8). Thirty-two spots were modulated after irradiation and 4 spots were different between SVZ and STR. From these last spots, only one spot was more abundant in the SVZ than in STR suggesting a protein specifically expressed in the SVZ.

Using non-irradiated SVZ as control, 5 spots were modulated 3 days after radiation, 16 spots were modulated at 7 days (Table 1). Sixteen spots were altered at day 7 after radiation when compared with day 3. In addition, SVZ samples were also compared with STR and 4 spots appeared as modulated 7 days following radiation. The variation in spot intensity was ranged between 1.2 and 1.9 that was in agreement with previously published data using similar 2D-gel approach (Broadwater, et al. 2011, Gasperini, et al. 2011).

These spots, according to their localisation on the 2D reference map (Fig. 8), displayed an heterogeneous repartition on the gel, with a large range of iso-electric points (from 4 to 8) and of molecular weights (from 13 to 46 kDa).

Different profiles were established according to spot modifications, as illustrated in the Fig. 9.

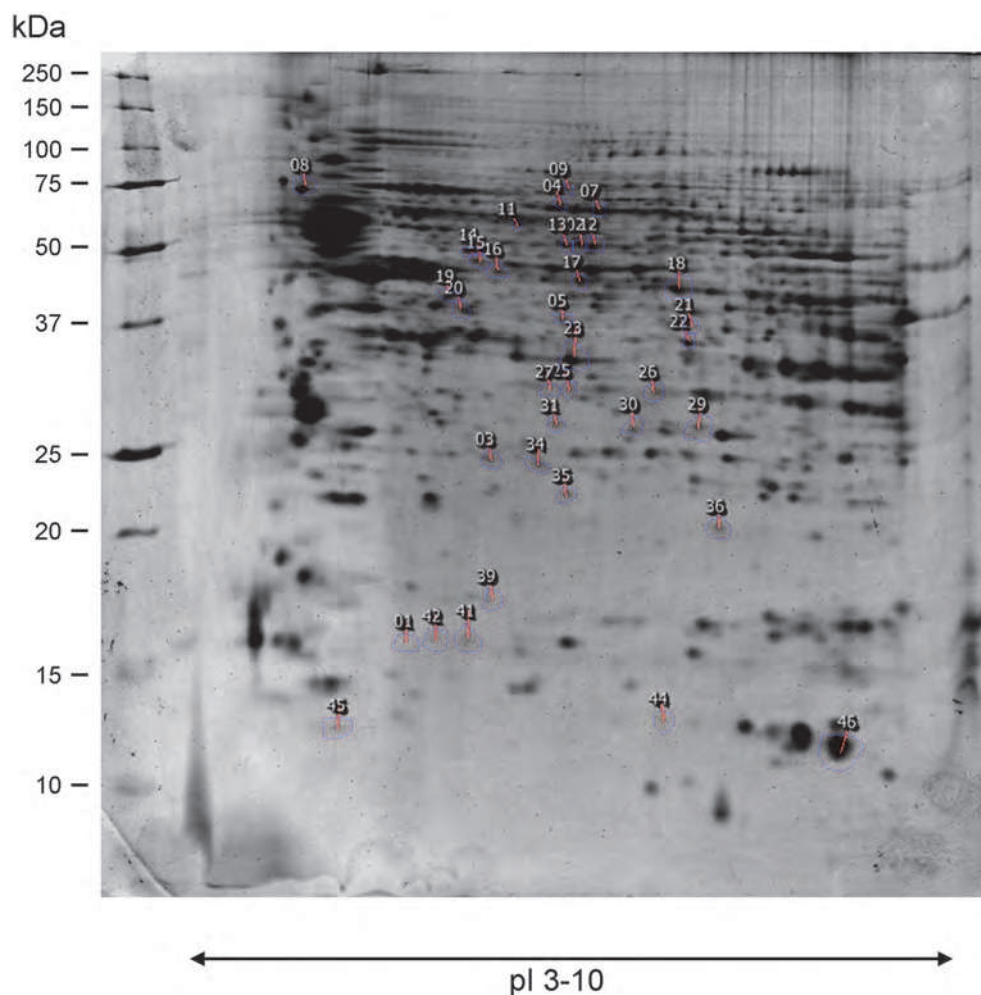
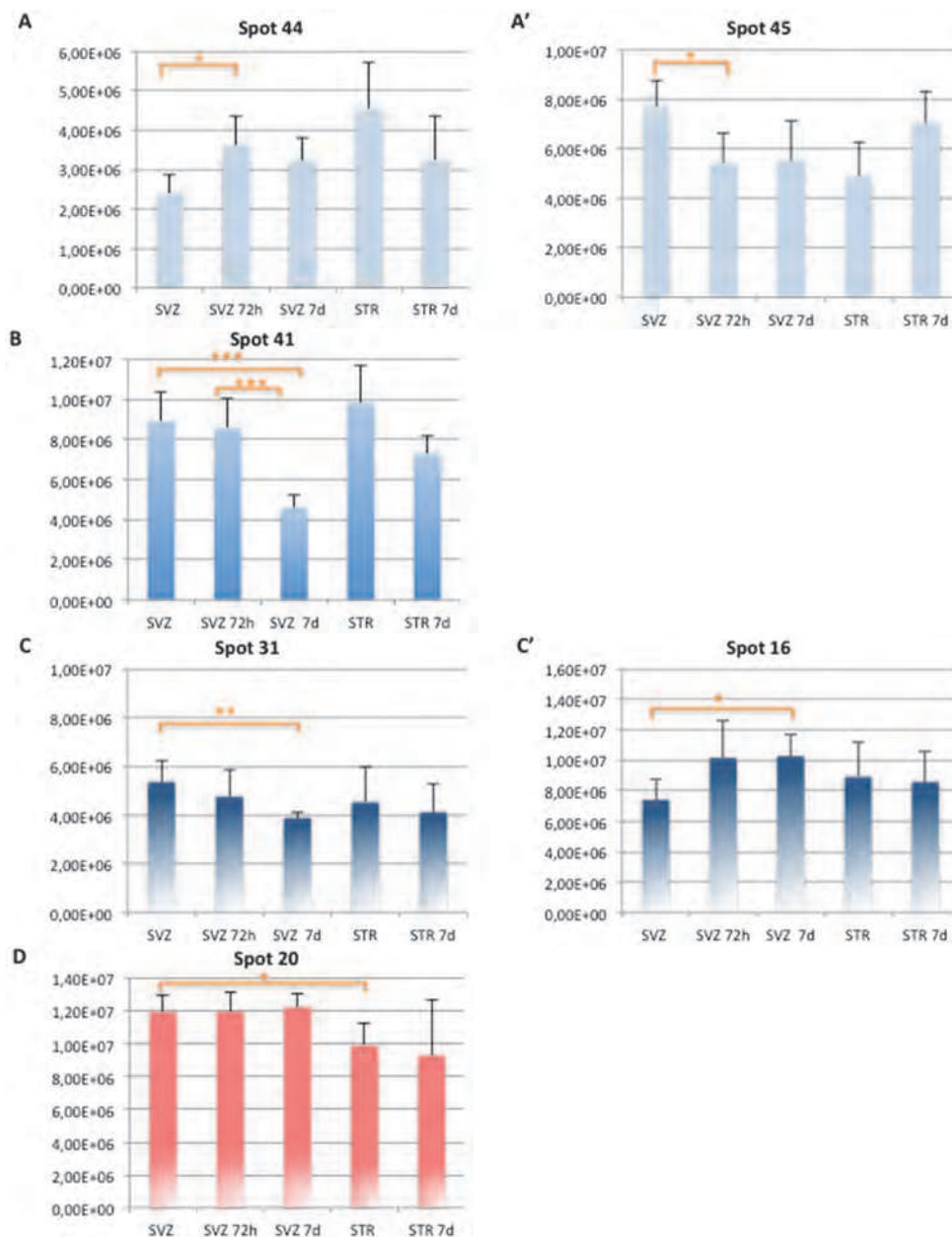


Fig. 8. Two-dimensional electrophoresis of SVZ proteins, separated under reducing conditions using 18-cm pH 3-10 strips for the first dimension, and a 12% acrylamide gel for the second dimension.



In comparison to non-irradiated SVZ: (A,A') early modified from 3 days after radiation, (B) downregulated by irradiation from 3 days to 7days or (C,C') late response to radiation at 7 days. In comparison to STR (D): no response to radiation. Numbers of spots corresponded to those listed in Fig. 3 and Table 1. Results are representative of volume intensity of the spot \pm standard deviation from 5 technical replicates.

Fig. 9. Intensity profiles of spots specifically modified in the SVZ

Interestingly, 79% of the spot variations were obtained from comparison between non-irradiated SVZ and irradiated SVZ and appeared to be specific of the SVZ. Forty three percent of these spots were found modified between 3 and 7 days post-irradiation that might underlie functions of these proteins during the intense proliferation phase. Thirteen percent of them were modified 3 days after radiation as compared with control SVZ suggesting a role for the proteins in the activation of quiescent NSCs.

The rest of them (21%) corresponded to spots altered in both regions after radiation in comparison to respective region controls, suggesting a role of these proteins in the response to radiation.

Among the 32 spots identified with a significant response to radiation, we eliminated 9 abundant spots (more than 0.1% of the total volume of spots) because they might not correspond to proteins involved in proliferation processes but rather have a cytoarchitecture function in the tissue. In a first round of analysis, among the 21 remaining spots, only 15 were abundant enough and well separated in the gel to be excised allowing identification by MS (Table 1).

3.4 Biological functions of the proteins

We verified the expression of the genes corresponding to the identified proteins (Table1) using the Allen Brain Atlas database (Fig. 10). This database contained a thorough list of genes expression in the mouse brain by RNA hybridization (<http://mouse.brain-map.org>) (Lein, et al.,2007). We found that indeed 47% of our identified proteins have its gene expressed in the SVZ; the others being at least expressed in the adjacent regions, i.e. striatum or in the corpus callosum (Fig. 10).

Identified proteins were classified according to their known biological activity (Fig. 11). Surprisingly, we did not identify proteins matching with growth factors or cell cycle regulation, as they may be present in too small quantity to be identified. Otherwise, we cannot exclude that gel resolution might not be optimized for the identification of this type of proteins.

Myelin basic protein (MBP) that wraps axons has been identified in two adjacent spots (41, 42) that varied according to Pi but not in their MW indicating posttranslational modifications. Strikingly, the amount of these spots decreased after radiation, which suggested a degradation of myelin sheets by radiation. This is of importance because MBP modifications have never been reported with such a low radiation dose (Tian, et al.,2008).

Otherwise, this current proteomic analysis of SVZ demonstrates that a 2 Gy-radiation exposure affected major cellular functions such as proteasome, energy production, vesicle trafficking and cytoskeletal maintenance.

Thirteen percent of the spots belong to the proteasome system known to be involved in the degradation of unneeded or damaged proteins by proteolysis (Mcbride, et al.,2003). The intensity of these spots were decreased between 3 and 7 days (spot) 34 or only 7 days post irradiation (spot 3) that might underscore a decrease of proteasome activity that has already been reported after irradiation in a variety of cell types (Mcbride, et al.,2002, Pajonk&Mcbride,2001). This reduction of proteasome activity has been proposed to be related, at least in part, to an increased expression of proteasome inhibitors (Conconi&Friguet, 1997, Zaiss, et al., 2002).

Twenty percent of the spots corresponded to proteins having functions in metabolism pathways. Two of them (5, 44) were modified within 3 days after radiation. Another was increased 7 days after radiation and the identified protein have been implicated in

Spot	Observed pI	MW	Abundance	Variations	reference sample	ANOVA (p)
1	5.28	16	0.03899	-1.9 in SVZ IR 7 -1.8 in SVZ IR 7	SVZ CT SVZ IR 3	0.008 0.013
2	6.53	49	0.09853	-1.3 in SVZ IR 7	SVZ IR 3	0.022
3	5.95	25	0.05079	+1.3 in SVZ IR 7	SVZ CT	0.033
4	6.4	62	0.06269	+1.3 in SVZ IR 7	SVZ IR 3	0.004
5	6.41	36	0.04725	-1.3 in SVZ IR 3	SVZ CT	0.012
7	6.68	60	0.27306	+1.3 in SVZ IR 7	SVZ IR 3	0.043
8	4.3	68	0.19432	+1.4 in STR CT	SVZ CT	0.05
9	6.44	68	0.01876	+1.3 in SVZ IR 7	SVZ IR 3	0.019
11	6.12	57	0.04227	-1.3 in STR IR 7	STR CT	0.031
12	6.61	49	0.10724	+1.2 in SVZ IR 7 +1.2 in SVZ IR 7	SVZ CT SVZ IR 3	0.05 0.010
13	6.43	49	0.06881	+1.2 in SVZ IR 7 +1.3 in STR CT	SVZ IR 3 SVZ CT	0.028 0.007
14	5.74	48	0.08356	+1.2 in SVZ IR 7	SVZ IR 3	0.004
15	5.82	46	0.08980	+1.3 in SVZ IR 7	SVZ CT	0.02
16	5.98	44	0.06190	+1.4 in SVZ IR 7	SVZ CT	0.021
17	6.53	43	0.10764	+1.3 in SVZ IR 7	SVZ IR 3	0.003
18	7.18	41	0.25750	+1.2 in STR CT	SVZ CT	0.018
19	5.58	40	0.07969	-1.2 in SVZ IR 3	SVZ CT	0.012
20	5.72	37	0.09955	-1.2 in STR CT	SVZ CT	0.012
21	7.28	36	0.03971	-1.4 in SVZ IR 7	SVZ CT	0.038
22	7.29	34	0.12789	+1.2 in SVZ IR 3 +1.4 in STR IR 7	SVZ CT STR CT	0.021 0.001
23	6.47	33	0.38047	+1.2 in STR CT	SVZ CT	0.011
25	6.47	30	0.03257	-1.7 in SVZ IR 7 -1.6 in SVZ IR 7	SVZ CT SVZ IR 3	0.027 0.047
26	7.04	30	0.05344	-1.5 in SVZ IR 7	SVZ CT	0.04
27	6.35	30	0.02708	-1.6 in SVZ IR 7 -1.6 in SVZ IR 7	SVZ CT SVZ IR 3	0.01 0.015
29	7.33	27	0.10550	-1.3 in SVZ IR 7 +1.4 in STR IR 7	SVZ IR 3 STR CT	0.041 0.004
30	6.88	27	0.05109	-1.3 in SVZ IR 7	SVZ CT	0.038
31	6.37	27	0.04457	-1.4 in SVZ IR 7	SVZ CT	0.01
34	6.24	24	0.05691	-1.3 in SVZ IR 7 -1.3 in SVZ IR 7	SVZ CT SVZ IR 3	0.017 0.036
35	6.45	22	0.03776	-1.4 in SVZ IR 7	SVZ CT	0.016
36	7.49	20	0.06499	-1.6 in SVZ IR 7	SVZ IR 3	0.046
39	5.92	17	0.02929	-1.4 in SVZ IR 7 -1.4 in SVZ IR 7	SVZ CT SVZ IR 3	0.015 0.018
41	5.74	16	0.07440	-1.9 in SVZ IR 7 -1.9 in SVZ IR 7	SVZ CT SVZ IR 3	0.001 0.001
42	5.5	16	0.04760	-1.6 in SVZ IR 7 -1.5 in STR IR 7	SVZ CT STR CT	0.002 0.013
44	7.09	13	0.02003	+1.5 in SVZ IR 3	SVZ CT	0.018
45	4.63	13	0.06425	-1.4 in SVZ IR 3	SVZ CT	0.028
46	8.48	12	0.94660	+1.4 in STR IR 7	STR CT	0.002

Table 1. List of spots significantly modified in: control SVZ; 3 days following radiation SVZ, 7 days following radiation SVZ, control STR; 7 days following radiation STR. Spot number; experimental protein molecular weight and pI; variation level, under-expressed (-) or over-expressed (+) in the corresponding sample, *vs* reference sample; and ANOVA, (significant when $p < 0.05$). Spots indicated in bold were excised from the gels and analysed by MS to allow the identification the proteins. The abundance corresponds to the ratio (%) of the volume one spot on the total volume of spots.

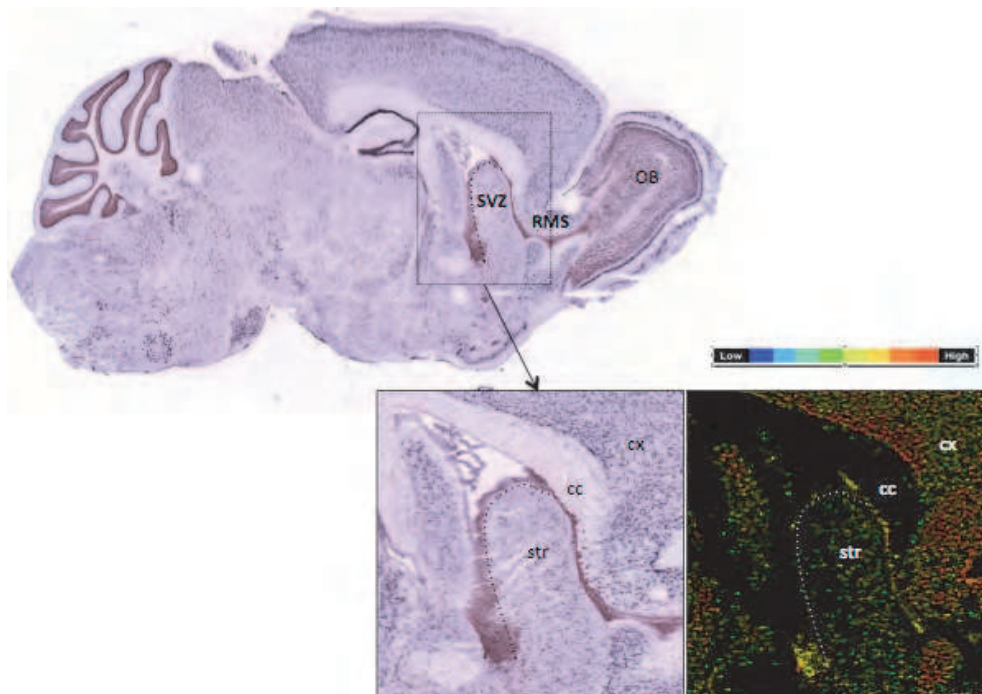


Fig. 10. An example of the expression of one gene corresponding to an identified protein using the Allen Brain Atlas database. This gene is expressed along the SVZ, a part of the RMS and also in the cortex (cx) but not in the corpus callosum (cc).

Biological functions	Spot number	Response to radiation
Mitochondrial respiratory chain	3	Late
	15	Late
	45	Early
Intracellular transport	20	No response
	30	Late
Proteasome	31	Late
	34	Mid
Metabolism	5	Early
	16	Late
	44	Early
Cytoskeleton	1	Mid
	19	Early
Axogenesis/myelination	25	Early
	41	Mid
	42	Late

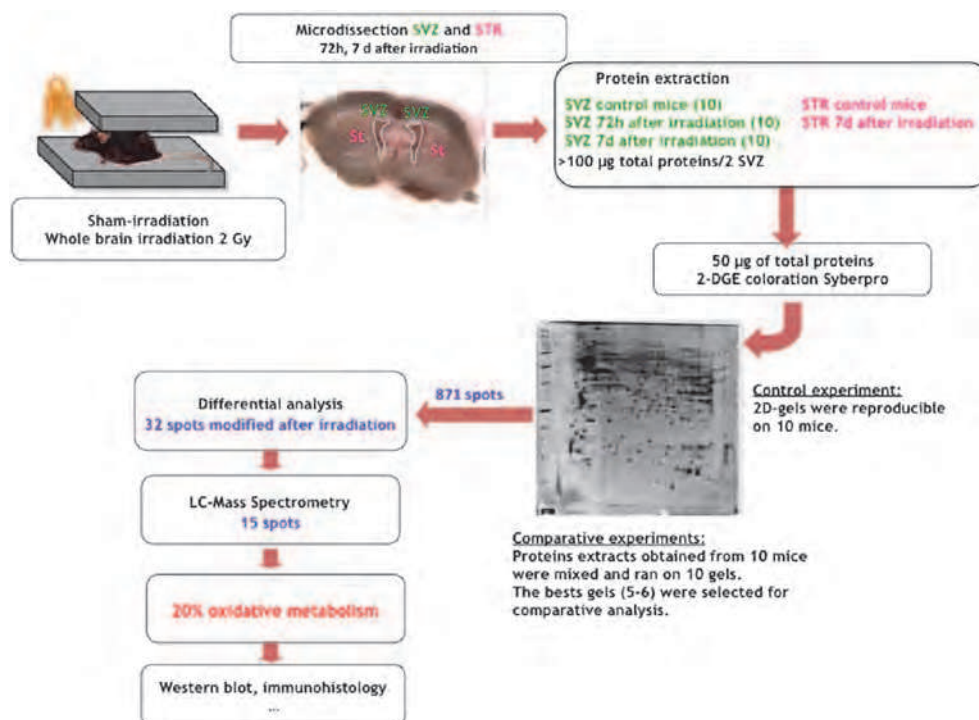
Fig. 11. Distribution of the proteins identified by MS according to their biological function.

phospholipid biosynthesis that might correspond to proteins involved in the organisation of membrane structure during cell proliferation. In our context, these identified proteins might interfere with the proliferation wave during SVZ regeneration.

Thirteen percent of the modulated proteins (spots 34, 30, 20) are central effectors in intracellular signal transduction pathways like GTPases mediating the formation of vesicles in neural cells, a fundamental process of neurotransmitter release (De Camilli, et al.,1995).

Thirteen percent of the spots referred to cytoskeleton proteins (spots 1, 19) showing alteration from day 3 to 7. Thus, this proteomic analysis revealed that radiation exposure influence the expression of proteins involved the reorganisation of actin cytoskeleton probably associated with proliferation and/or migration.

It appeared that 20% of the modulated proteins were known for being implicated in oxidative metabolism. One of them (spot 45) decreased early after radiation that might reflect a radio-induced defect of mitochondrial metabolism. The two other spots (3, 15) were



From 871 spots, 32 spots showed variations of intensity after irradiation. Among the last spots, we analysed and identified 17 spots. Twenty-six percents of the identified proteins matched with proteins already described in oxidative metabolism. The next step of this work will consist firstly, in confirming these variations of intensity by other technical approaches such as western blot and immunohistochemistry and secondly, in demonstrating their involvement in the neurogenesis stimulation after SVZ irradiation.

Fig. 12. Schematic representation of the current comparative proteomic analysis from control SVZ and 2Gy-irradiated SVZ at 3 and 7 days after exposure.

increased 7 days after radiation probably as a consequence of an increased metabolic activity of proliferating SVZ cells.

The approach of the current proteomic analysis and the main results are represented in the Fig. 12. The next step of this work will be the validation of the variation of identified proteins and a deep analysis to demonstrate their involvement in neurogenesis stimulation following SVZ radiation and their potential use to stimulate neurogenesis in aged brains and/or neurodegenerative diseases.

4. Conclusion

This preliminary study demonstrates that 2D-gel electrophoresis is an accurate global proteomic analysis to analyse modifications in very small brain regions. In our model of neurogenic niche regeneration after 2Gy irradiation, which is associated with stem cell proliferation, we have identified proteins, which have major cellular functions such as energy production, cytoskeletal maintenance and vesicle trafficking. Interestingly, identified proteins have functions known to be involved in pathways previously reported to be altered by radiation which underscores the reliability of our proteomic approach. Especially, proteins involved in mitochondrial respiratory chain have been identified in our study; they produce energy and generate reactive oxygen species. Acharya et al. have shown that human NSCs significantly increased their oxidative and nitrosative stresses after radiation (Acharya, et al. 2010). The importance of endogenous oxygen reactive species to control NSC proliferation has been reported as well (Le Belle, et al. 2010). Moreover, oxidative stress is implicated in the progression of aging and neurodegenerative disorders (Berlett&Stadtman, 1997, Butterfield, et al.,1997, Lauderback, et al.,2002, Richardson, 2009). In light of these studies, our data concerning mitochondrial respiratory chain are very promising. This chapter describes the first part of our project, including a validation of the technical strategy, with examples of protein functions, associated with SVZ regeneration following 2Gy irradiation. The characterization of identified proteins is still under investigation, and needs further biological validations.

5. Acknowledgment

This work was supported by grants of ANR-SEST (Neurorad) and Electricité de France.

6. References

- Acharya, M. M., Lan, M. L., Kan, V. H., Patel, N. H., Giedzinski, E., Tseng, B. P. & Limoli, C. L., (2010), Consequences of ionizing radiation-induced damage in human neural stem cells. *Free Radic Biol Med*, Vol. 49, No.12, pp. 1846-1855, 1873-4596 (Electronic)
- Alonso, G., (1999). Neuronal progenitor-like cells expressing polysialylated neural cell adhesion molecule are present on the ventricular surface of the adult rat brain and spinal cord. *J Comp Neurol*, Vol. 414, No.2, pp. 149-166, 0021-9967 (Print)
- Anderson, N. L., Nance, S. L., Tollasken S. L., Giere F. A., Anderson N. G., (1985), Quantitative reproducibility of measurements from coomassie blue-stained two-dimensional gels-analysis of mouse-liver protein-patterns and comparison of BALC/C and C57 strains. *Electrophoresis*, Vol. 6; No12, pp. 592-599, 0173-0835 (Print).
- Alvarez-Buylla, A. & Lim, D. A., (2004). For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron*, Vol. 41, No.5, pp. 683-686, 0896-6273 (Print)
- Berlett, B. S. & Stadtman, E. R., (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem*, Vol. 272, No.33, pp. 20313-20316, 0021-9258 (Print)

- Broadwater, L., Pandit, A., Clements, R., Azzam, S., Vadnal, J., Sulak, M., Yong, V. W., Freeman, E. J., Gregory, R. B. & McDonough, J., (2011), Analysis of the mitochondrial proteome in multiple sclerosis cortex. *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1812, No.5, pp. 630-641, 0006-3002 (Print)
- Butterfield, D. A., Howard, B. J., Yatin, S., Allen, K. L. & Carney, J. M., (1997). Free radical oxidation of brain proteins in accelerated senescence and its modulation by N-tert-butyl-alpha-phenylnitron. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 94, No.2, pp. 674-678, 0027-8424 (Print)
- Castegna, A., Aksenov, M., Thongboonkerd, V., Klein, J. B., Pierce, W. M., Booze, R., Markesbery, W. R. & Butterfield, D. A., (2002). Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part II: dihydropyrimidinase-related protein 2, alpha-enolase and heat shock cognate 71. *J Neurochem*, Vol. 82, No.6, pp. 1524-1532, 0022-3042 (Print)
- Cayre, M., Bancila, M., Virard, I., Borges, A. & Durbec, P., (2006). Migrating and myelinating potential of subventricular zone neural progenitor cells in white matter tracts of the adult rodent brain. *Mol Cell Neurosci*, Vol. 31, No.4, pp. 748-758, 1044-7431 (Print)
- Conconi, M. & Friguet, B., (1997). Proteasome inactivation upon aging and on oxidation-effect of HSP 90. *Mol Biol Rep*, Vol. 24, No.1-2, pp. 45-50, 0301-4851 (Print)
- De Camilli, P., Takei, K. & McPherson, P. S., (1995). The function of dynamin in endocytosis. *Curr Opin Neurobiol*, Vol. 5, No.5, pp. 559-565, 0959-4388 (Print)
- Doetsch, F., (2003). A niche for adult neural stem cells *Curr Opin Genet Dev*, Vol. 13, No.5, pp. 543-550, 0959-437X (Print)
- Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J. M. & Alvarez-Buylla, A., (1999). Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 96, No.20, pp. 11619-11624, 0027-8424 (Print)
- Dubois-Dalcq, M., (2005). Development and regeneration of oligodendrocytes: therapeutic perspectives in demyelinating diseases. *Bull Mem Acad R Med Belg*, Vol. 160, No.10-12, pp. 407-415; discussion 415-406, 0377-8231 (Print)
- Gasperini, L., Piubelli, C. & Carboni, L., (2011), Proteomics of rat hypothalamus, hippocampus and pre-frontal/frontal cortex after central administration of the neuropeptide PACAP, *Mol Biol Rep*, Vol. pp. 1573-4978 (Electronic)
- Goings, G. E., Sahni, V. & Szele, F. G., (2004). Migration patterns of subventricular zone cells in adult mice change after cerebral cortex injury. *Brain Res*, Vol. 996, No.2, pp. 213-226, 0006-8993 (Print)
- Hopewell, J. W., Cavanagh, J. B., (1972). Effects of X-irradiation on the mitotic activity of the subependymal plate of rats. *Br. J. Radiol.*, Vol. 45, pp. 461-465., 0007-1285 (Print)
- Ihrie, R. A. & Alvarez-Buylla, A., (2011), Lake-front property: a unique germinal niche by the lateral ventricles of the adult brain. *Neuron*, Vol. 70, No.4, pp. 674-686, 1097-4199 (Electronic)
- Jankovski, A., Garcia, C., Soriano, E. & Sotelo, C., (1998). Proliferation, migration and differentiation of neuronal progenitor cells in the adult mouse subventricular zone surgically separated from its olfactory bulb. *Eur J Neurosci*, Vol. 10, No.12, pp. 3853-3868, 0953-816X (Print)
- Lauderback, C. M., Kanski, J., Hackett, J. M., Maeda, N., Kindy, M. S. & Butterfield, D. A., (2002). Apolipoprotein E modulates Alzheimer's Abeta(1-42)-induced oxidative damage to synaptosomes in an allele-specific manner. *Brain Res*, Vol. 924, No.1, pp. 90-97, 0006-8993 (Print)
- Le Belle, J. E., Orozco, N. M., Paucar, A. A., Saxe, J. P., Mottahedeh, J., Pyle, A. D., Wu, H. & Kornblum, H. I., (2011), Proliferative neural stem cells have high endogenous ROS

- levels that regulate self-renewal and neurogenesis in a PI3K/Akt-dependant manner. *Cell Stem Cell*, Vol. 8, No.1, pp. 59-71, 1875-9777 (Electronic)
- Lein, E. S., Hawrylycz, M. J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., Boe, A. F., Boguski, M. S., Brockway, K. S., Byrnes, E. J., Chen, L., Chen, T. M., Chin, M. C., Chong, J., Crook, B. E., Czaplinska, A., Dang, C. N., Datta, S., Dee, N. R., Desaki, A. L., Desta, T., Diep, E., Dolbeare, T. A., Donelan, M. J., Dong, H. W., Dougherty, J. G., Duncan, B. J., Ebbert, A. J., Eichele, G., Estin, L. K., Faber, C., Facer, B. A., Fields, R., Fischer, S. R., Fliss, T. P., Frensley, C., Gates, S. N., Glattfelder, K. J., Halverson, K. R., Hart, M. R., Hohmann, J. G., Howell, M. P., Jeung, D. P., Johnson, R. A., Karr, P. T., Kawal, R., Kidney, J. M., Knapik, R. H., Kuan, C. L., Lake, J. H., Laramée, A. R., Larsen, K. D., Lau, C., Lemon, T. A., Liang, A. J., Liu, Y., Luong, L. T., Michaels, J., Morgan, J. J., Morgan, R. J., Mortrud, M. T., Mosqueda, N. F., Ng, L. L., Ng, R., Orta, G. J., Overly, C. C., Pak, T. H., Parry, S. E., Pathak, S. D., Pearson, O. C., Puchalski, R. B., Riley, Z. L., Rockett, H. R., Rowland, S. A., Royall, J. J., Ruiz, M. J., Sarno, N. R., Schaffnit, K., Shapovalova, N. V., Sivasay, T., Slaughterbeck, C. R., Smith, S. C., Smith, K. A., Smith, B. I., Sodt, A. J., Stewart, N. N., Stumpf, K. R., Sunkin, S. M., Sutram, M., Tam, A., Teemer, C. D., Thaller, C., Thompson, C. L., Varnam, L. R., Visel, A., Whitlock, R. M., Wornoutka, P. E., Wolkey, C. K., Wong, V. Y., Wood, M., Yaylaoglu, M. B., Young, R. C., Youngstrom, B. L., Yuan, X. F., Zhang, B., Zwingman, T. A. & Jones, A. R., (2007). Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*, Vol. 445, No.7124, pp. 168-176, 1476-4687 (Electronic)
- Lim, D. A., Tramontin, A. D., Trevejo, J. M., Herrera, D. G., Garcia-Verdugo, J. M. & Alvarez-Buylla, A., (2000). Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis *Neuron*, Vol. 28, No.3, pp. 713-726, 0896-6273 (Print)
- Liu, X., Wang, Q., Haydar, T. F. & Bordey, A., (2005). Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nat Neurosci*, Vol. 8, No.9, pp. 1179-1187, 1097-6256 (Print)
- Macas, J., Nern, C., Plate, K. H. & Momma, S., (2006). Increased generation of neuronal progenitors after ischemic injury in the aged adult human forebrain. *J Neurosci*, Vol. 26, No.50, pp. 13114-13119, 1529-2401 (Electronic)
- Mathieu, C., Sii-Felice, K., Fouchet, P., Etienne, O., Haton, C., Mabondzo, A., Boussin, F. D. & Mouthon, M. A., (2008). Endothelial cell-derived bone morphogenetic proteins control proliferation of neural stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci*, Vol. 38, No.4, pp. 569-577, 1095-9327 (Electronic)
- McBride, W. H., Iwamoto, K. S., Syljuasen, R., Pervan, M. & Pajonk, F., (2003). The role of the ubiquitin/proteasome system in cellular responses to radiation. *Oncogene*, Vol. 22, No.37, pp. 5755-5773, 0950-9232 (Print)
- McBride, W. H., Pajonk, F., Chiang, C. S. & Sun, J. R., (2002). NF-kappa B, cytokines, proteasomes, and low-dose radiation exposure. *Mil Med*, Vol. 167, No.2 Suppl, pp. 66-67, 0026-4075 (Print)
- Ming, G. L., Song, H. (2011). Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*, Vol. 70, No.4, pp. 687-702, 1097-4199 (Electronic)
- Morshead, C. M., Reynolds, B. A., Craig, C. G., McBurney, M. W., Staines, W. A., Morassutti, D., Weiss, S. & van der Kooy, D., (1994). Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron*, Vol. 13, No.5, pp. 1071-1082, 0896-6273 (Print)
- Pajonk, F. & McBride, W. H., (2001). Ionizing radiation affects 26s proteasome function and associated molecular responses, even at low doses. *Radiother Oncol*, Vol. 59, No.2, pp. 203-212, 0167-8140 (Print)

- Pastrana, E., Cheng, L. C. & Doetsch, F., (2009). Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 106, No.15, pp. 6387-6392, 1091-6490 (Electronic)
- Picard-Riera, N., Decker, L., Delarasse, C., Goude, K., Nait-Oumesmar, B., Liblau, R., Pham-Dinh, D. & Evercooren, A. B., (2002). Experimental autoimmune encephalomyelitis mobilizes neural progenitors from the subventricular zone to undergo oligodendrogenesis in adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 99, No.20, pp. 13211-13216, 0027-8424 (Print)
- Ramirez-Castillejo, C., Sanchez-Sanchez, F., Andreu-Agullo, C., Ferron, S. R., Aroca-Aguilar, J. D., Sanchez, P., Mira, H., Escribano, J. & Farinas, I., (2006). Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. *Nat Neurosci*, Vol. 9, No.3, pp. 331-339, 1097-6256 (Print)
- Richardson, R. B., (2009). Ionizing radiation and aging: rejuvenating an old idea Aging (Albany NY), Vol. 1, No.11, pp. 887-902, 1945-4589 (Electronic)
- Romanko, M. J., Rola, R., Fike, J. R., Szele, F. G., Dizon, M. L., Felling, R. J., Brazel, C. Y. & Levison, S. W., (2004). Roles of the mammalian subventricular zone in cell replacement after brain injury. *Prog Neurobiol*, Vol. 74, No.2, pp. 77-99, 0301-0082 (Print)
- Shinohara, C., Gobbel, G. T., Lamborn, K. R., Tada, E. & Fike, J. R., (1997). Apoptosis in the subependyma of young adult rats after single and fractionated doses of X-rays. *Cancer Res*, Vol. 57, No.13, pp. 2694-2702, 0008-5472 (Print)
- Shoemaker, L. D., Orozco, N. M., Geschwind, D. H., Whitelegge, J. P., Faull, K. F. & Kornblum, H. I., (2010), Identification of differentially expressed proteins in murine embryonic and postnatal cortical neural progenitors. *PLoS One*, Vol. 5, No.2, pp. e9121, 1932-6203 (Electronic)
- Sung, J. H., Cho, E. H., Min, W., Kim, M. J., Kim, M. O., Jung, E. J. & Koh, P. O., (2010), Identification of proteins regulated by estradiol in focal cerebral ischemic injury--a proteomics approach. *Neurosci Lett*, Vol. 477, No.2, pp. 66-71, 1872-7972 (Electronic)
- Tada, E., Yang, C., Gobbel, G. T., Lamborn, K. R. & Fike, J. R., (1999). Long-term impairment of subependymal repopulation following damage by ionizing irradiation *Exp Neurol*, Vol. 160, No.1, pp. 66-77, 0014-4886 (Print)
- Tavazoie, M., Van der Veken, L., Silva-Vargas, V., Louissaint, M., Colonna, L., Zaidi, B., Garcia-Verdugo, J. M. & Doetsch, F., (2008). A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell*, Vol. 3, No.3, pp. 279-288, 1875-9777 (Electronic)
- Tian, Y., Shi, Z., Yang, S., Chen, Y. & Bao, S., (2008). Changes in myelin basic protein and demyelination in the rat brain within 3 months of single 2-, 10-, or 30-Gy whole-brain radiation treatments. *J Neurosurg*, Vol. 109, No.5, pp. 881-888, 0022-3085 (Print)
- Yamashita, T., Ninomiya, M., Hernandez Acosta, P., Garcia-Verdugo, J. M., Sunabori, T., Sakaguchi, M., Adachi, K., Kojima, T., Hirota, Y., Kawase, T., Araki, N., Abe, K., Okano, H. & Sawamoto, K., (2006). Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J Neurosci*, Vol. 26, No.24, pp. 6627-6636, 1529-2401 (Electronic)
- Yang, S., Liu, T., Li, S., Zhang, X., Ding, Q., Que, H., Yan, X., Wei, K. & Liu, S., (2008). Comparative proteomic analysis of brains of naturally aging mice. *Neuroscience*, Vol. 154, No.3, pp. 1107-1120, 0306-4522 (Print)
- Zaiss, D. M., Standera, S., Kloetzel, P. M. & Sijts, A. J., (2002). PI31 is a modulator of proteasome formation and antigen processing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 99, No.22, pp. 14344-14349, 0027-8424 (Print)

ARTICLE 2 :

Quiescent neural stem cells exit dormancy upon alteration of GABA_AR signaling following radiation damage

Mathieu Daynac, Alexandra Chicheportiche, Jose R. Pineda, Laurent R. Gauthier, François D. Boussin and Marc-André Mouthon.

Publié dans **Stem cell research** (accepted manuscript 02/2013)

Nous montrons dans le premier article que la repopulation de la ZSV après irradiation est suivie par la prolifération des CSN, ce qui suggère que les CSN quiescentes s'activent et entrent en cycle après irradiation. Cependant, aucune étude ne prouve que les CSN restent en dehors du cycle cellulaire avant d'être activées par des signaux favorisant leur prolifération, et aucune méthode permettant la purification des CSN quiescentes n'a été publiée. Afin de mieux caractériser les CSN quiescentes et les signaux contrôlant leur activation, j'ai mis en place pour cet article une technique de tri par cytométrie en flux pour purifier les populations cellulaires de la zone sous-ventriculaire de souris C57Bl6 adultes (2-3 mois).

Les cellules ont d'abord été sélectionnées par le marqueur vital d'ADN Hoechst 33342 et selon l'expression de trois marqueurs membranaires : CD15/LeX, CD24 et EGF ligand. Cette stratégie nous a permis d'isoler 5 populations de la ZSV :

- CSN quiescentes [CD24-LeXbrightEGFR-],
- CSN activées [CD24-LeX+EGFR+],
- TACs (cellules de type C) [CD24-LeX-EGFR+]
- Neuroblastes immatures [CD24+LeX-EGFR+]
- Neuroblastes [CD24+LeX-EGFR-].

Les populations triées ont été caractérisées par immuno-fluorescence et par qRT-PCR en utilisant des marqueurs spécifiques ainsi qu'*in vitro* dans des cultures de neurosphères avec ou sans facteurs de croissance. De plus nous avons examiné le cycle cellulaire des populations triées par évaluation de leur contenu en ADN et par l'expression l'ARNm de cyclines caractéristiques de différentes phases du cycle cellulaire. Nous avons complété cette analyse par l'utilisation de souris FUCCI dont les cellules fluorescent en fonction de leur état dans le cycle (Sakaue-Sawano et al., 2008). Ceci nous a permis de prouver que :

- les CSN [CD24-LeXbrightEGFR-] triées étaient bien quiescentes, tandis que les CSN activées [CD24-LeX+EGFR+] proliféraient activement.

Nous avons confirmé par injection intraventriculaire de Dil fluorescent que :

- les populations souches [CD24-LeXbrightEGFR-] et [CD24-LeX+EGFR+] contactaient le ventricule, caractéristique indispensable des souches neurales de la ZSV.

C'est la première fois qu'une stratégie de tri cellulaire par cytométrie en flux permet à la fois de distinguer et de trier les CSNs quiescentes et activées, ainsi que les progéniteurs nerveux.

Nous avons vu dans le premier article que l'exposition du cerveau adulte à des doses modérées d'irradiation provoque la mort ces cellules en prolifération, i.e TACs et neuroblastes, suivie par une reprise de la neurogenèse associée à des changements majeurs dans le métabolisme cellulaire. Mais les mécanismes associés à la reprise de la neurogenèse, notamment au niveau des cellules souches, restent incompris. Nous avons montré grâce à des analyses in situ que suite à une dose de 4Gy,

- les CSN activées, cellules de type C ainsi que les neuroblastes et les cellules en prolifération, i.e. Mash1+, Dcx+ et BrdU+, mourraient pour plus 90% d'entre elles après irradiation.
- En revanche, les cellules GFAP+ bordant le ventricule, représentant les CSN, ne semblent pas être altérées par l'irradiation.

Nous avons ensuite confirmé la radio-résistance des CSNs par cytométrie en flux : seules les CSNs quiescentes [CD24-LeXbrightEGFR-] résistent au traitement et sont enrichies 48h après irradiation. Une fois prouvé que les CSNs quiescentes résistent à l'irradiation contrairement aux cellules différenciées, nous avons montré qu'elles rentrent en cycle après irradiation et qu'elles sont responsables de la reprise de la neurogenèse. En effet :

- Plus de 80% des cellules en prolifération ou en mitose (BrdU+ FucciGreen+ pRb+ ou pH3+) 48h après irradiation expriment la GFAP, et sont EGFR- et Mash1-, ce qui correspondrait donc à l'entrée en cycle de CSNs quiescentes 48h après irradiation.

Ces résultats ont été confirmés par cytométrie en flux où la majorité des cellules qui entrent en prolifération 48h après irradiation sont les [CD24-LeXbrightEGFR-]. Par ailleurs, ces travaux prouvent pour la première fois que les CSN quiescentes bordant les ventricules latéraux du cerveau adulte murin rentrent en cycle après une dose modérée d'irradiation pour rétablir la neurogenèse, avant d'exprimer l'EGFR suggérant que la voie de l'EGFR n'est donc pas nécessaire à l'entrée en cycle des CSN quiescentes.

Afin de mieux élucider les signaux responsables de leur entrée en prolifération, nous nous sommes intéressés aux signaux médiés par la niche neurogénique sur le contrôle de l'activation des CSNs après irradiation. Les récepteurs au GABA_A (GABAAR) sont des canaux ioniques hétéropentamériques exprimés sur les cellules de type B1, C et A dans la ZSV (Platel et al., 2010b). L'activation des GABAAR réduit la prolifération des progéniteurs embryonnaires (Haydar et al., 2000) (LoTurco et al., 1995) (Wang et al., 2003), les progéniteurs post-nataux (Nguyen et al., 2003) et les CSN et progéniteurs adultes (Liu et al., 2005) (Fernando et al., 2011). GABA est relargué par les neuroblastes dans la SVZ et exerce une inhibition de la prolifération des CSN via la phosphorylation de l'histone H2AX (Fernando et al., 2011). Cependant, le rôle de la voie du GABAAR sur la sortie de quiescence et l'activation des CSN n'a pas encore été déterminé. Ici nous montrons *in vivo* que :

- L'injection d'un antagoniste aux GABAAR (bicuculline) entraîne l'entrée en cycle des CSNs quiescentes, tandis que le traitement avec un agoniste aux GABAAR (muscimol) bloque la reprise de la neurogenèse pendant les premiers jours suivant l'irradiation.

Ces résultats montrent que la perte de la voie de signalisation du GABAAR après irradiation provoque l'entrée en cycle des CSN quiescentes, ce qui suggère fortement que le neurotransmetteur GABA maintient les CSN dans leur état de quiescence en condition physiologique. Cette étude décrit la voie de signalisation au GABAAR comme un mécanisme contrôlant la taille de la niche dans la ZSV, via la régulation de la quiescence des CSN.



Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/scr



Quiescent neural stem cells exit dormancy upon alteration of GABA_AR signaling following radiation damage

Mathieu Daynac, Alexandra Chicheportiche, Jose R. Pineda, Laurent R. Gauthier, François D. Boussin*, Marc-André Mouthon*

CEA DSV iRCM SCSR, Laboratoire de Radiopathologie, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France
INSERM, U967, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France
Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, UMR 967, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France
Université Paris Sud, UMR 967, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France

Received 5 November 2012; received in revised form 12 February 2013; accepted 26 February 2013

Abstract Quiescent neural stem cells (NSCs) are considered the reservoir for adult neurogenesis, generating new neurons throughout life. Until now, their isolation has not been reported, which has hampered studies of their regulatory mechanisms. We sorted by FACS quiescent NSCs and their progeny from the subventricular zone (SVZ) of adult mice according to the expression of the NSC marker LeX/CD15, the EGFR receptor (EGFR) and the CD24 in combination with the vital DNA marker Hoechst 33342. Characterization of sorted cells showed that the LeX^{bright}/EGFR-negative population was enriched in quiescent cells having an NSC phenotype. In contrast to proliferating NSCs and progenitors, the LeX^{bright}/EGFR-negative cells, i.e. quiescent NSCs, resisted to a moderate dose of gamma-radiation (4 Gy), entered the cell cycle two days after irradiation prior to EGFR acquisition and ultimately repopulated the SVZ. We further show that the GABA_AR signaling regulates their cell cycle entry by using specific GABA_AR agonists/antagonists and that the radiation-induced depletion of neuroblasts, the major GABA source, provoked their proliferation in the irradiated SVZ. Our study demonstrates that quiescent NSCs are specifically enriched in the LeX^{bright}/EGFR-negative population, and identifies the GABA_AR signaling as a regulator of the SVZ niche size by modulating the quiescence of NSCs.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations: Dcx, Doublecortin; FUCCI, Fluorescence Ubiquitination Cell Cycle Indicator; GFAP, Glial Fibrillary Acidic Protein; GLAST, Glutamate Aspartate Transporter; LeX, Lewis X; NSC, Neural stem cell; SVZ, Subventricular zone; TAC, Transit-amplifying cell.

* Corresponding authors at: CEA, DSV, iRCM, SCSR, Laboratoire de Radiopathologie, BP n° 6, 92265 Fontenay-aux-Roses cedex, France. Fax: +33 1 46 54 91 80.

E-mail addresses: boussin@cea.fr (F.D. Boussin), marc-andre.mouthon@cea.fr (M.-A. Mouthon).

Introduction

The adult forebrain contains neural stem cells (NSCs) within the subventricular zone (SVZ), and these cells ensure neurogenesis during adulthood (Doetsch et al., 1999a). Adult NSCs successively give rise to transit amplifying cells (TACs) and then neuroblasts. Neuroblasts then migrate in chains to the olfactory bulbs, where they differentiate into neurons (Lois et al., 1996). Adult-born neurons in the olfactory bulbs are critical

for olfactory memory (Lazarini et al., 2009). Adult NSCs, also known as type B cells, contact the lateral ventricle, have an astrocytic phenotype and express Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) (Doetsch et al., 1999a; Garcia et al., 2004). NSCs also express the cell surface carbohydrate Lewis X (LeX)/CD15 (Capela and Temple, 2002; Obermair et al., 2010).

Adult NSCs have been considered relatively quiescent, with a cell cycle length lasting several days under physiological conditions, in contrast to 12 h for TACs (Morshead et al., 1994). Killing the constitutively proliferating cells in the SVZ using antimetabolic drugs leaves quiescent NSCs intact, has few effects on the number of NSCs and results in a complete recovery of neurogenesis in the SVZ through repopulation from the relatively quiescent NSCs (Doetsch et al., 1999b; Morshead et al., 1994). Similarly, exposure of the adult brain to a moderate dose of ionizing radiation provokes the death of proliferating cells, such as TACs and neuroblasts (Chevalier et al., 2012; Shinohara et al., 1997; Tada et al., 1999). This phenomenon is followed by NSC proliferation and the recovery of cells in the SVZ, suggesting that quiescent NSCs are activated to re-enter the cell cycle with major alterations in oxidative metabolism (Chevalier et al., 2012). Using *GFAP::GFP* transgenic mice combined with CD24 and a fluorophore-complexed EGF ligand, Pastrana et al. reported the appearance of cycling NSCs with a *GFAP*⁺*EGFR*⁺ phenotype after exposure to an antimetabolic drug; using a FACS approach, the authors prospectively isolated these activated NSCs (Pastrana et al., 2009). These findings suggest that a population of quiescent NSCs exists that are capable of re-entering the cell cycle and restoring neurogenesis after SVZ depletion. However, recent studies fail to show that quiescent adult NSCs exist outside the cell cycle and remain in stasis until activated by appropriate proliferative signals, and to-date, no prospective methods have been reported to sort this population of cells.

GABA_A receptors (GABA_AR) are heteropentameric ion channels with prevalent expression on immature cells, including astrocyte-like SVZ cells, TACs and neuroblasts (Platel et al., 2010). Previous studies reveal that GABA_AR activation decreases the proliferation of embryonic neocortical progenitors (Haydar et al., 2000; LoTurco et al., 1995; Wang et al., 2003), early postnatal neural progenitors (Nguyen et al., 2003) and adult NSCs and TACs (Fernando et al., 2011; Liu et al., 2005). In the SVZ, GABA produced by neuroblasts exerts a feedback mechanism inhibiting the proliferation of astrocyte-like SVZ cells (Liu et al., 2005). The inhibition of GABA_AR signaling resulting from an endogenous expression of Diazepam binding inhibitor in TACs stimulates their proliferation in the early postnatal SVZ (Alfonso et al., 2012). Downstream GABA signaling in NSCs has been linked to histone H2AX phosphorylation, which limits proliferation (Fernando et al., 2011); however, the effects of GABA signaling on NSC exiting quiescence or in the activation of NSCs have yet to be determined. Further investigations are warranted to identify whether perturbations of GABA neurotransmitter signaling upon injury impact the recruitment and proliferation of NSCs.

Here, we isolated quiescent NSCs and activated NSCs and demonstrated that the stress-induced elimination of neuroblasts provokes NSCs to exit quiescence through limitations in GABA inhibitory signaling.

Materials and methods

Animals and irradiation procedure

Young adult (2–3 months old) C57Bl/6 mice were used in this study. The animals were maintained with access to food and water ad libitum in a colony room kept at a constant temperature (19 °C–22 °C) and humidity (40–50%) on a 12:12 h light/dark cycle. For cell cycle analysis, transgenic Fluorescence Ubiquitination Cell Cycle Indicator (FUCCI) green mice were used (Sakaue-Sawano et al., 2008). Mice were anesthetized with ketamine anesthesia (75 mg/kg, Imalgén, Merial, Lyon, France) and medetomidine (1 mg/kg, Domitor, Pfizer, Paris, France), and the entire head was exposed to a ⁶⁰Co source in a medical irradiator (Alcyon); one lead shield protected the rest of the body during ⁶⁰Co exposure. A total dose of 4 Gy was given (1 Gy/min). After exposure, an intraperitoneal (i.p.) injection of atipamezole (1 mg/kg, Antisedan, Pfizer, Paris, France) was used to reverse the anesthesia.

Animal experiments were carried out in compliance with the European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC) and were approved by our institutional committee on animal welfare (CETEA-CEA DSV IdF).

Drug administration

In vivo treatments involved the i.p. administration of muscimol (Sigma, 4 mg/kg) or bicuculline (Sigma, 4 mg/kg) twice daily as previously reported (Fernando et al., 2011).

Immunofluorescence

Deeply anesthetized animals received an intra-cardiac perfusion of 4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate, pH 7.4. Brains were post-fixed for 2 h in 4% PFA, cryoprotected in incrementing 10–30% sucrose/PBS. Serial coronal cryostat sections were made at 14 µm of thickness. Brain sections were blocked in phosphate buffered saline (PBS) containing 0.1% Triton X100 and were incubated with primary antibody overnight at 4 °C. The following primary antibodies were used: mouse anti-GFAP (1:400, Mab3402, Millipore), rabbit polyclonal anti-GFAP (1:400, Sigma), anti-GFAP-647-conjugated (GA5) (1:400, mAb3657, Cell Signaling), mouse anti-BrdU (1:300, RPN202, GE Healthcare), goat anti-Dcx (1:200, clone C-18 sc-8066, SantaCruz), mouse anti-Nestin (1:100, BD), rabbit anti-cleaved caspase-3 (Asp175) (1:100, mAb9579, Cell Signaling), mouse anti-Mash1 (1:100, mAb556604, BD Biosciences), rabbit anti-monomeric Azami-Green 1 (1:200, PM052, Clinisciences), mouse IgG1 anti-EGFR (1:100, BD Biosciences), rabbit anti-phospho-Rb ser 807/811 (1:200 Cell Signaling), and rabbit anti-acetyl and phospho-histone H3 Lys9/Ser10 (1:100 Cell Signaling). After several washes in PBS containing 0.1% Triton X-100, slices were incubated with the appropriate secondary antibody (Alexa Fluor series at 1:200, Invitrogen, USA) for 2 h at room temperature. To label cycling cells, BrdU was injected intraperitoneally 3 h before the mice were sacrificed; BrdU was revealed using anti-BrdU kit (Amersham) after a pretreatment of slices with DNase (Sigma). Staining was replicated in at least 2–3 slices from three different mice. Z-stacks were

acquired on a laser-scanning confocal microscope (Olympus FluoView 1000) with a 40× oil immersion objective. The number of cells (Mash1+, Dcx+, Fucci green+ or BrdU+) was quantified in each Z-section. Images were analyzed using LAS LF (Bitplane AG, Switzerland) and reconstructed in Image J and Photoshop CS3 (Adobe, USA).

Preparation of SVZ cells and FACS

Lateral ventricle walls containing cells from the SVZ were microdissected under a binocular dissection microscope and collected in a cold 0.6% glucose/PBS solution. SVZ cells were incubated at 37 °C with papain and then dissociated into single-cell suspensions by flushing the cells through a p200 micropipette tip, as previously described (Sii-Felice et al., 2008). Experiments were conducted to efficiently dissociate cells without affecting antibody binding, and the optimal dissociation time was determined to be 10 min. For DNA content analysis, dissociated cells were incubated for 1 h 30 min at 37 °C with 5 µg/mL Hoechst 33342 (Sigma) in DMEM:F12 medium supplemented with 2% B27 (Mouthon et al., 2006). Then, the cells were washed in PBS containing 0.15% bovine serum albumin. For mouse cell-surface marker analysis, we used CD24 phycoerythrin [PE]-conjugated (rat IgG2b; 1:50 BD Biosciences), LeX/CD15 fluorescein isothiocyanate [FITC]-conjugated (mouse IgM; 1:50 BD Biosciences), Alexa647-conjugated EGF (1:200, Life Technologies), and APC-conjugated anti-Glutamate Aspartate Transporter (GLAST) antibodies (ACSA-1 mouse/rat, 1:10 MACS Miltenyi Biotec). Antibodies were titrated over a semi-log scale to determine the appropriate dilution in the PBS/0.15% bovine albumin serum solution and then incubated at 4 °C for 25 min. The cells were washed prior to sorting or analysis. Immediately prior to FACS, propidium iodide (PI) or Hoechst 33258 was added to a final concentration of 2 µg/mL to label dead cells. The cells were analyzed on a LSRII (BD Biosciences) and sorted on an INFLUX (BD Biosciences). Sorting gates were drawn according to fluorescence minus one (FMO) controls. Only living cells were analyzed for the surface expression whereas dying cells and doublets were excluded. Ependymal cells expressing a high level of CD24 (Pastrana et al., 2009) were outside the gates. The data were analyzed using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

Labeling of cells that contact the ventricle with Dil

An intra-ventricular injection of lipophilic carbocyanine SP-DiI18 (3) (5 µL at 20 µg/mL; Invitrogen) was performed using a stereotaxic apparatus (David Kopf model 900 Small Animal Stereotaxic Instrument) 24 h prior to microdissection. CD24-positive and -negative SVZ cells were sorted using CD24-PE and anti-PE immunomagnetic beads on a LD column (Miltenyi Biotec).

Cultures of sorted SVZ cells

For neurosphere cultures, sorted cells were plated at a density of $1\text{--}3 \times 10^3$ cells/well in 24-well tissue culture plates (TPP, Switzerland). The culture medium was composed of NeuroCult medium complemented with the proliferation supplement (STEMCELL Technologies), 2 µg/mL

heparin, 20 ng/mL EGF and 10 ng/mL FGF-2. Seven days after plating, the neurospheres were counted, mechanically dissociated and subcultured in 6-well plates.

For adherent cultures, sorted cells were plated on poly-D lysine coated plates in DMEM:F12 supplemented with 2% B27, without growth factors (Costa et al., 2011).

The cultures were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

RNA isolation and qRT-PCR

After sorting, cells were immediately lysed in RLT-Plus buffer (QIAGEN). Total RNA was isolated with the RNeasy MICRO kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions.

Q-PCR was performed on an ABI PRISM 7200 Sequence Detector System using SYBR Green for RT-PCR. cDNA was synthesized using the Reverse Transcription High Capacity Master Mix (Applied Biosystems) with specific primers (Eurogentec). Expression levels were normalized to GAPDH.

Statistical analyses

Non-parametric tests were conducted using StatView5 software (SAS Institute Inc., Cary, NC); the Kruskal–Wallis test was used for multiple comparisons, and the Mann–Whitney test was used for two comparisons. The statistical significance was set at $P < 0.05$. The data are expressed as the mean \pm SEM.

Results

Sorting of NSCs and their progeny in the adult SVZ

To isolate NSCs and their progeny by FACS from the adult mouse SVZ, we used the reputed stem/progenitor marker LeX (Capela and Temple, 2002) combined with an anti-CD24 antibody to label neuroblasts (Calaora et al., 1996) and a fluorescent EGF to label EGFR on actively proliferating cells (Pastrana et al., 2009). Six populations have been sorted according to FACS gating (Fig. 1A and Fig. S1A) and were analyzed for cell-type-specific markers by immuno-phenotyping, qRT-PCR and their capacity to form colonies in vitro (Figs. 1B–E).

- (i) The most abundant sorted SVZ population was CD24⁺LeX[−]EGFR[−] cells (hereafter called CD24⁺), representing $26.6 \pm 0.6\%$ of SVZ cells, and was mostly composed of neuroblasts as they expressed the specific marker Dcx (Brown et al., 2003) (Figs. 1B, C and Fig. S1D). Consistently with the cell cycle exit of neuroblasts, those cells were unable to form colonies in vitro (Fig. S2).
- (ii) The CD24⁺LeX[−]EGFR⁺ population (hereafter called CD24⁺EGFR⁺, $4.3 \pm 0.2\%$ of SVZ cells) contained a majority of Dcx⁺ neuroblasts. However, most of CD24⁺EGFR⁺ cells also expressed Mash1 (Figs. 1C, D and Fig. S1D), a basic helix–loop–helix transcription factor expressed in TACs (Parras et al., 2004). Moreover, these cells were able to proliferate in vitro, forming neurospheres (Fig. S2), arguing that this population corresponded to immature neuroblasts.
- (iii) The CD24[−]LeX[−]EGFR⁺ population (hereafter called EGFR⁺; $2.5 \pm 0.2\%$ of SVZ cells) was mostly composed of Mash1⁺ cells but was devoid of Dcx and GFAP (Figs. 1B–D)

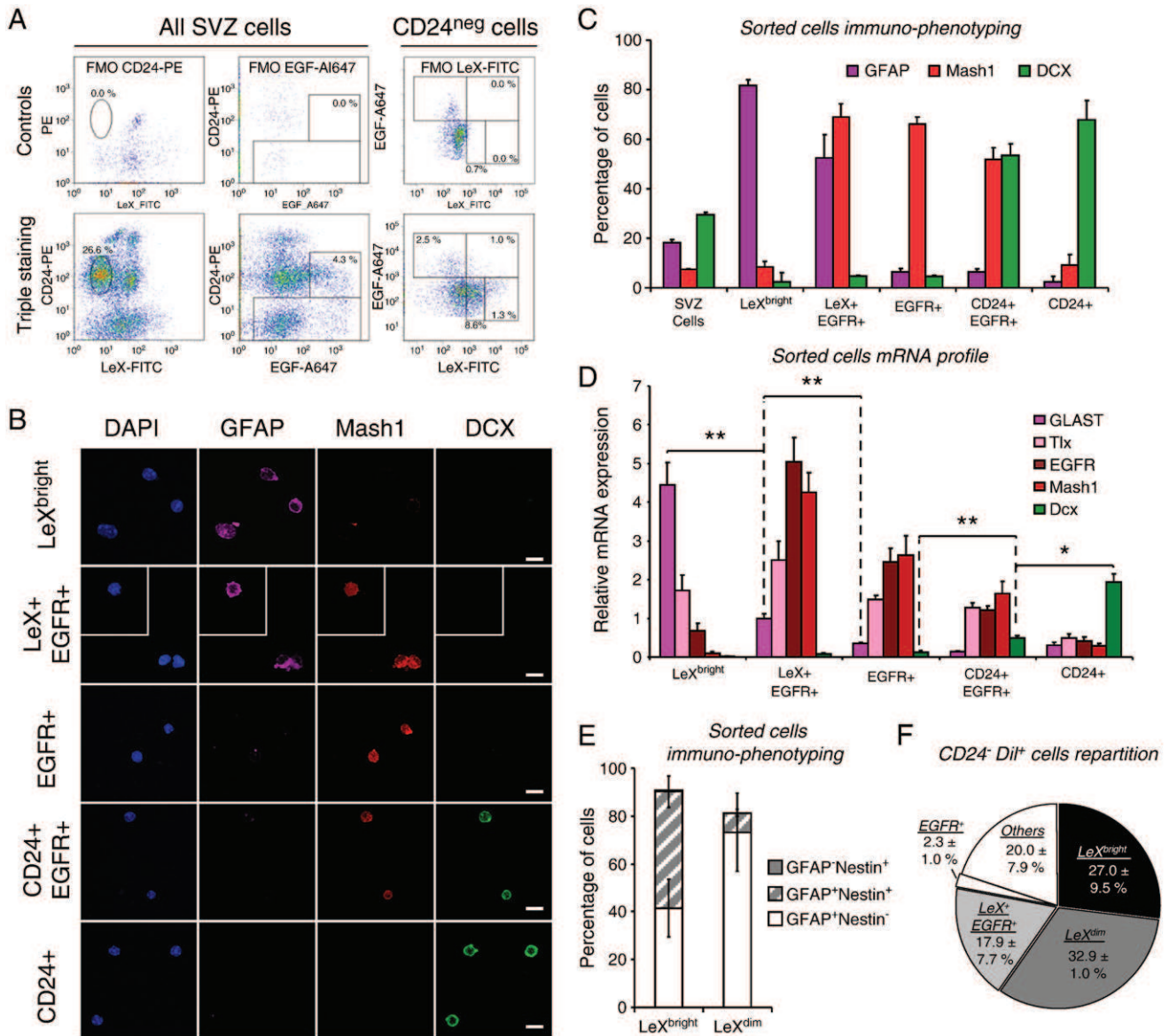


Figure 1 Purification of stem cells and their progeny from the adult SVZ. FACS plots are shown for fluorescence minus one (FMO) controls (upper panel in A) and LeX/CD24/EGFR triple staining (lower panel in A). FACS-sorted populations were immuno-phenotyped for GFAP, Mash1 and Dcx (B–C), and the expression of specific mRNAs was quantified by qRT-PCR (D). (E) GFAP/Nestin double immunostaining of LeX^{bright} and LeX^{dim} cells. (F) After intra-ventricular Dil injection and the removal of CD24⁺ cells, FACS analyses showed that the Dil⁺ cells, i.e. the cells contacting the lateral ventricle, were mostly LeX-positive cells. Data were obtained from 3 to 10 independent experiments. *P < 0.05, **P < 0.01. Scale bars: 10 μ m.

and, in addition, EGFR⁺ cells formed neurospheres (Fig. S2). These data confirm that the EGFR⁺ population is mostly composed of TACs.

- (iv) CD24⁻LeX⁺EGFR⁺ cells (hereafter called LeX⁺EGFR⁺; $1.0 \pm 0.1\%$ of SVZ cells) expressed Mash1 together with GFAP and GLAST (Figs. 1B–D and Fig. S1C), another astroglial markers expressed on NSCs (Mori et al., 2006). Remarkably, LeX⁺EGFR⁺ cells had the greatest capacity to form self-renewing secondary neurospheres (Fig. S2B). LeX⁺EGFR⁺ population had also the highest colony-forming capacity in adherent cultures (Fig. S2C), forming clones with both astrocytes and neuroblasts, reminiscent of an asymmetrical NSC division (Costa et al., 2011). Therefore, these data show that the

proliferating NSCs were contained in the LeX⁺EGFR⁺ population.

The CD24⁻LeX⁺EGFR⁻ population was split into two distinct populations according to the expression level of LeX: (v) LeX^{dim} cells ($8.6 \pm 0.4\%$ of SVZ cells) and (vi) LeX^{bright} cells ($1.3 \pm 0.1\%$ of SVZ cells). Neither LeX^{bright} population nor LeX^{dim} population was able to form clones in vitro (Figs. S2A–C). Nestin immuno-phenotyping was thus assessed to investigate the presence of NSCs in these populations. LeX^{dim} population was mostly composed of GFAP⁺Nestin⁻ mature astrocytes (73%) and contained only 8% of GFAP⁺Nestin⁺ cells (Fig. 1E). By contrast, LeX^{bright} population was noticeably enriched in GFAP⁺Nestin⁺ cells

(48.9%) (Fig. 1E) and expressed genes for GFAP, GLAST and Tlx, reminiscent of their NSC phenotype. These cells did not express genes for EGFR and Mash1 two markers of TACs and activated NSCs (Figs. 1C–D).

A cardinal characteristic of NSCs is that they contact the lateral ventricle, exposing their primary cilia to the flow of the cerebrospinal fluid (Doetsch et al., 1999a). Thus, a fluorescent Dil cell tracer was injected into the lateral ventricle to label cells contacting the lateral ventricle before cell sorting. Analysis of the repartition of the Dil⁺ cells among CD24 negative populations shows that 17.9% was in the LeX⁺EGFR⁺ population corresponding to activated NSCs and 27% in the LeX^{bright} population (Fig. 1F). This result shows that LeX^{bright} cells contact the ventricle, in accordance with the presence of NSCs in this sorted population. Altogether these data suggest that LeX^{bright} population is enriched in candidate NSCs and was thus further characterized.

LeX^{bright} population contains quiescent NSCs

To gain insight into the cell cycling of the different cell populations, the proportion of cells with DNA content > 2 N, i.e., cells in the S/G2/M phases of the cell cycle, was determined using vital DNA staining with Hoechst 33342 (Mouthon et al., 2006). The proportion of S/G2/M cells was 27.7% in the LeX⁺EGFR⁺ and 27.4% in the EGFR⁺ populations; this proportion was even higher in the CD24⁺EGFR⁺ population (35.5%; Fig. 2A'). However, CD24⁺ cells proliferated to a lesser extent (7%), and the LeX^{bright} cells underwent limited DNA synthesis (0.2%; Fig. 2A').

Cell cycle analysis was further assessed using FUCCI green mice in which cells are green during the S/G2 phases and colorless for the rest of the cell cycle (Sakaue-Sawano et al., 2008) (Fig. 2B). This approach confirmed that actively cycling populations were contained in the EGFR-expressing populations, with the highest level of S/G2 cells (40.0%) in the CD24⁺EGFR⁺ population (Fig. 2B'). The EGFR[−] population that contained the LeX^{bright} population was almost completely devoid of proliferating green cells (0.5%; Fig. 2B'); this supports the hypothesis that these cells contain quiescent NSCs.

Cyclins are cell cycle regulators; their mRNA expression levels depend on the phase of the cell cycle. The expression of cyclins was examined in sorted SVZ populations (Fig. 2C). Cyclin C is required for cells to exit the G0 phase and enter the cell cycle (Ren and Rollins, 2004). Cyclin C is expressed in LeX^{bright} cells at the same level as in other SVZ populations. As expected, populations expressing EGFR had the highest expression levels for all cyclins associated with cell cycle progression, i.e. cyclin D1 during G1, cyclin A2 during S, and cyclin B1 during G2/M. Notably, CD24⁺EGFR⁺ cells had the highest levels of cyclin B1 and Ki67, which is consistent with their high proliferative activity observed above. Ki67 mRNA expression was also directly correlated with the proliferative state of the SVZ populations. Remarkably, LeX^{bright} cells had nearly undetectable levels of Ki67 and other cyclins associated with cell cycle progression.

Altogether, these findings confirm that our sorting strategy allows the prospective isolation of the main populations of adult SVZ, such as activated NSCs and TACs, and can serve as a powerful tool for sorting quiescent NSCs within the LeX^{bright} population.

LeX^{bright} cells resist radiation and allow repopulation of the SVZ

We tested the capacity of quiescent NSCs to resist genotoxic stress and to repopulate the SVZ after whole brain irradiation. Irradiation with gamma-radiation at a dose of 4 Gy provoked a high level of p53-dependent apoptosis of SVZ cells within hours (Fig. S3A), in accordance with a previous report (Chow et al., 2000). In situ analyses revealed that the number of proliferating cells, TACs and neuroblasts, such as BrdU⁺, Mash1⁺ and Dcx⁺, dropped by more than 90% 48 h after irradiation (Figs. 3B–D). By contrast, the amount of GFAP⁺ cells lining the lateral ventricle, evocative of NSCs, appeared not altered by irradiation (Fig. 3A). These GFAP⁺ cells presented a transient increase in DNA damage shown by the formation of γ H2AX foci, a marker for DNA double strand breaks (Figs. S8A–B). Afterwards, the number of γ H2AX foci returned to normal values at 48 h after exposure suggesting that NSCs had repaired their DNA damages (Figs. S8A–B). Remarkably, Mash1⁺ and BrdU⁺ cells recovered thereafter with levels greater than the normal values for Mash1⁺ cells at day 7 and the recovery of Mash1⁺ TACs preceded the recovery of neuroblasts, in agreement with the chronologic differentiation process (Figs. 3B–D). All tested markers recovered to normal levels at day 14. In addition, qRT-PCR on whole SVZ cells confirmed that NSC markers, such as GLAST and TLX, were maintained 24–48 h after irradiation, whereas markers for TACs (Mash1, Sox2, Nestin) and neuroblasts (Dcx), as well as Ki67, were profoundly reduced (Fig. 3E).

To confirm that the radio-resistant NSCs were able to give rise to progeny, we performed a single injection of BrdU 48 h after irradiation; 3 days later, we observed Dcx⁺BrdU⁺ cells in the SVZ (Fig. S4B). Then, we injected BrdU between 48 h and 4 days after exposure (1 injection/day for 3 days), followed by a chase of 16 days. GFAP-positive cells that retained long-term BrdU labeling were present in the SVZ (Fig. S4D), reminiscent of slowly dividing NSCs (Morshead et al., 1994). Moreover, Dcx⁺BrdU⁺ cells were observed in the olfactory bulbs (Fig. S4E), confirming that NSCs proliferating early after irradiation were able to produce neuroblasts that migrate into the olfactory bulbs.

We used our FACS method to evaluate the effects of irradiation on the different SVZ cell populations. The decreased numbers of proliferating cells in the SVZ 48 h after exposure were confirmed both by analyzing the proportion of cells with DNA content > 2 N and by using FUCCI green mice (Figs. S5A, B). A decrease in the LeX⁺EGFR⁺, EGFR⁺, CD24⁺EGFR⁺ and CD24⁺ populations was observed shortly after irradiation with a minimum at 24–48 h (Fig. 3F and Fig. S6). Concomitantly, LeX^{bright} cells showed a relative increase, being 6 times more abundant than LeX⁺EGFR⁺, EGFR⁺ at 48 h (Fig. S6), revealing their resistance to radiation. Thereafter, LeX⁺EGFR⁺, EGFR⁺, CD24⁺EGFR⁺ and CD24⁺ recovered successively, in agreement with their differentiation stage, and all populations reached normal levels at day 10 and remained stable for one year after exposure (Fig. 3F and Figs. S8C, D).

We have previously shown that brain exposure with a total radiation dose of 15 Gy divided into three doses of 5 Gy that were delivered at 48 h intervals blocks permanently SVZ neurogenesis, while NSCs are preserved for long-term (Pineda et al., 2013). Consistently, we observed that two months after 3 × 5 Gy irradiation the levels of

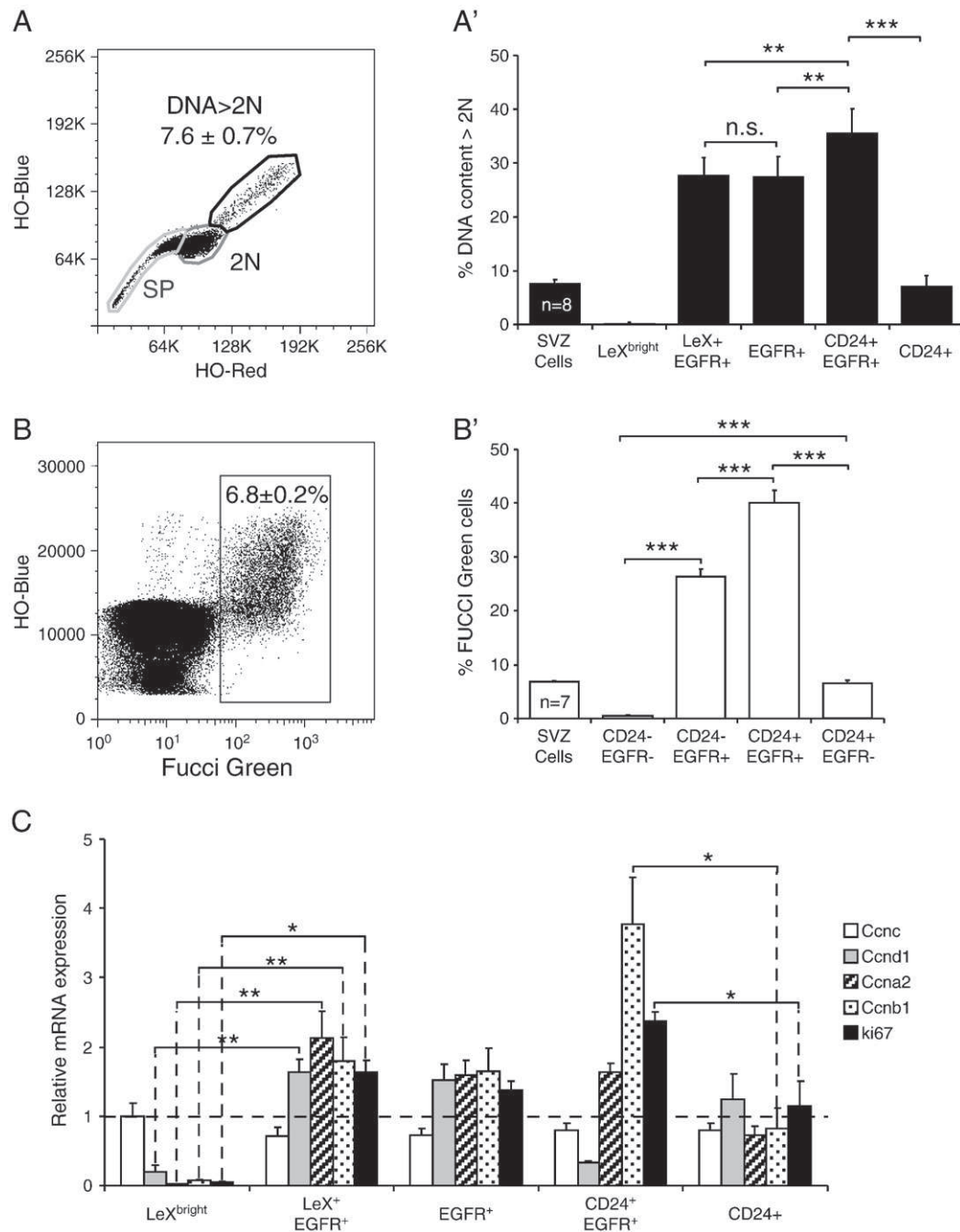


Figure 2 EGFR-positive populations contain proliferative cells, whereas the LeX^{bright} population contains quiescent NSCs. Proliferation was determined in the SVZ using the vital DNA marker HO33242 (A) and Fucci green mice in which cells are green during the S-G2 phases (B). Percentages of proliferating cells are shown for each SVZ population in A' (DNA content > 2 N) and B' (Fucci green positive cells). (C) Relative mRNA expression of typical cell-cycle genes was quantified by qRT-PCR. Data were obtained from 5 to 8 independent experiments. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (for clarity all the comparisons are not shown).

LeX⁺EGFR⁺, EGFR⁺, CD24⁺EGFR⁺ and CD24⁺ cells were strongly reduced whereas LeX^{bright} cells were still present with a level even higher than in non-irradiated controls (Fig. S6).

Therefore, whereas most proliferating SVZ cells, including activated NSCs, TACs and neuroblasts, are highly sensitive to radiation and died shortly after exposure, our findings strongly suggest that quiescent NSCs with a LeX^{bright} phenotype are

highly resistant to radiation, allowing the recovery of neurogenesis after moderate radiation dose.

LeX^{bright} cells enter S-phase following exposure prior to EGFR acquisition

Recovery of the SVZ appeared to start 48 h after exposure to 4 Gy, while pycnotic nuclei were still observed among

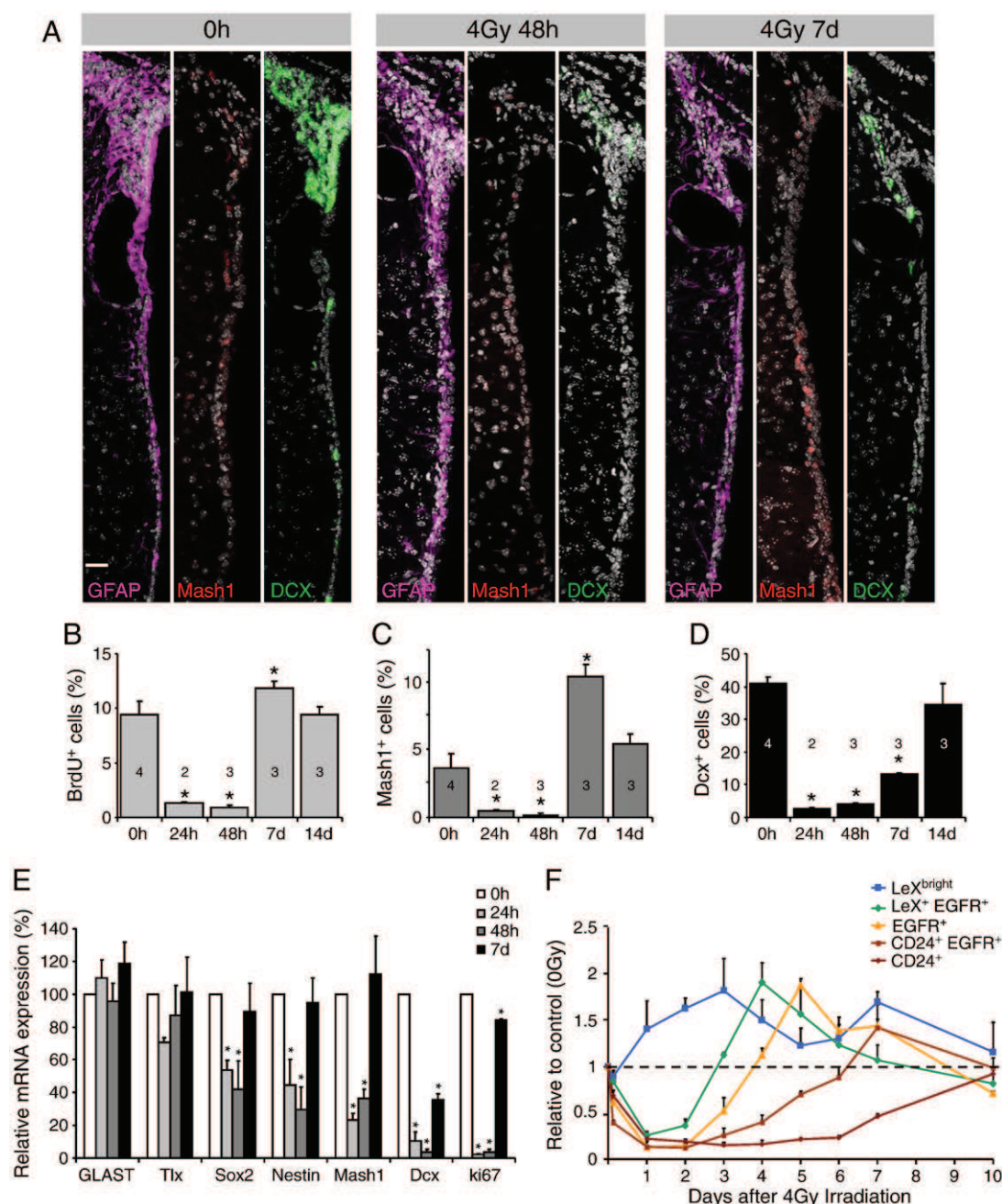


Figure 3 LeX^{bright} cells resisted radiation, whereas proliferating SVZ populations were altered. (A) Immunostaining on coronal brain sections for GFAP, Mash1 and Dcx in the SVZ after irradiation. (B–D) Quantifications of immunostaining are shown with the number of mice indicated within the bars. (E) Relative mRNA expression of stem cell lineage markers was quantified by qRT-PCR in total SVZ cells. (F) The relative amount of different SVZ populations was determined by FACS. Data were obtained from at least 3 independent experiments. Statistical analyses were performed and compared before irradiation. *P < 0.05. Scale bars: 20 μ m.

BrdU-positive or FUCCI green-positive cells at 24 h (Fig. S3B). Therefore, we injected BrdU 46 h after exposure and examined the first cells entering the S phase 2 h later. Forty-eight hours after irradiation, most BrdU⁺ cells expressed GFAP (142 ± 16 cells along the whole SVZ), and $81 \pm 4\%$ of these BrdU⁺GFAP⁺ cells contacted the lateral ventricle and therefore had an NSC phenotype (Figs. 4A, G). However, incorporation of BrdU was never observed in ependymal cells, i.e. cells lining the ventricle, which is different to what was observed after stroke (Carlen et al.,

2009). In situ analysis of GFAP expression in FUCCI green cells or in cells expressing phosphorylated retinoblastoma protein or the phosphorylated H3 histone, confirmed that astrocyte-like NSCs were cycling at 48 h post irradiation (Figs. 4B–D). Remarkably, most, if not all, of these proliferating NSCs lacked EGFR expression at this time and showed weak Mash1 expression (Figs. 4C, E'), suggesting that these proliferating NSCs were in an early phase of activation.

Cell cycle entry of NSCs was further analyzed by FACS, focusing on the populations of cells that progressed through

the S/G2 phases for cells obtained from irradiated Fucci mice or through the S/G2/M phases based on their DNA content. Activated NSCs and TACs contained in the $\text{LeX}^+\text{EGFR}^+$ and EGFR^+ populations or in the EGFR^+ population of Fucci green mice, were highly proliferating prior to irradiation and showed a dramatic decrease 48 h after exposure (Figs. 4H, J and K). By contrast, the EGFR^- population of Fucci green mice, containing $\text{LeX}^{\text{bright}}$ NSCs, entered cell cycle after irradiation (Fig. 4I). We observed that S-phase entry of this EGFR^- population peaked 48 h after irradiation, with 67.5% of those cells within the Fucci green population, followed by a progressive recovery to reach normal values by day 7 (Fig. 55C).

The radio-resistant $\text{LeX}^{\text{bright}}$ population, which underwent limited DNA synthesis before irradiation, showed a strong rise in DNA $> 2N$ cells 48 h after irradiation (Fig. 4L).

Altogether, our data show that quiescent $\text{LeX}^{\text{bright}}$ NSCs entered the cell cycle following radiation exposure prior to the acquisition of EGFR and allow repopulation of the SVZ for long term.

Activation of GABA_AR delays recovery after irradiation

GABA released from neurons in the adult hippocampus dictates the NSC choice between quiescence and activation (Song et al.,

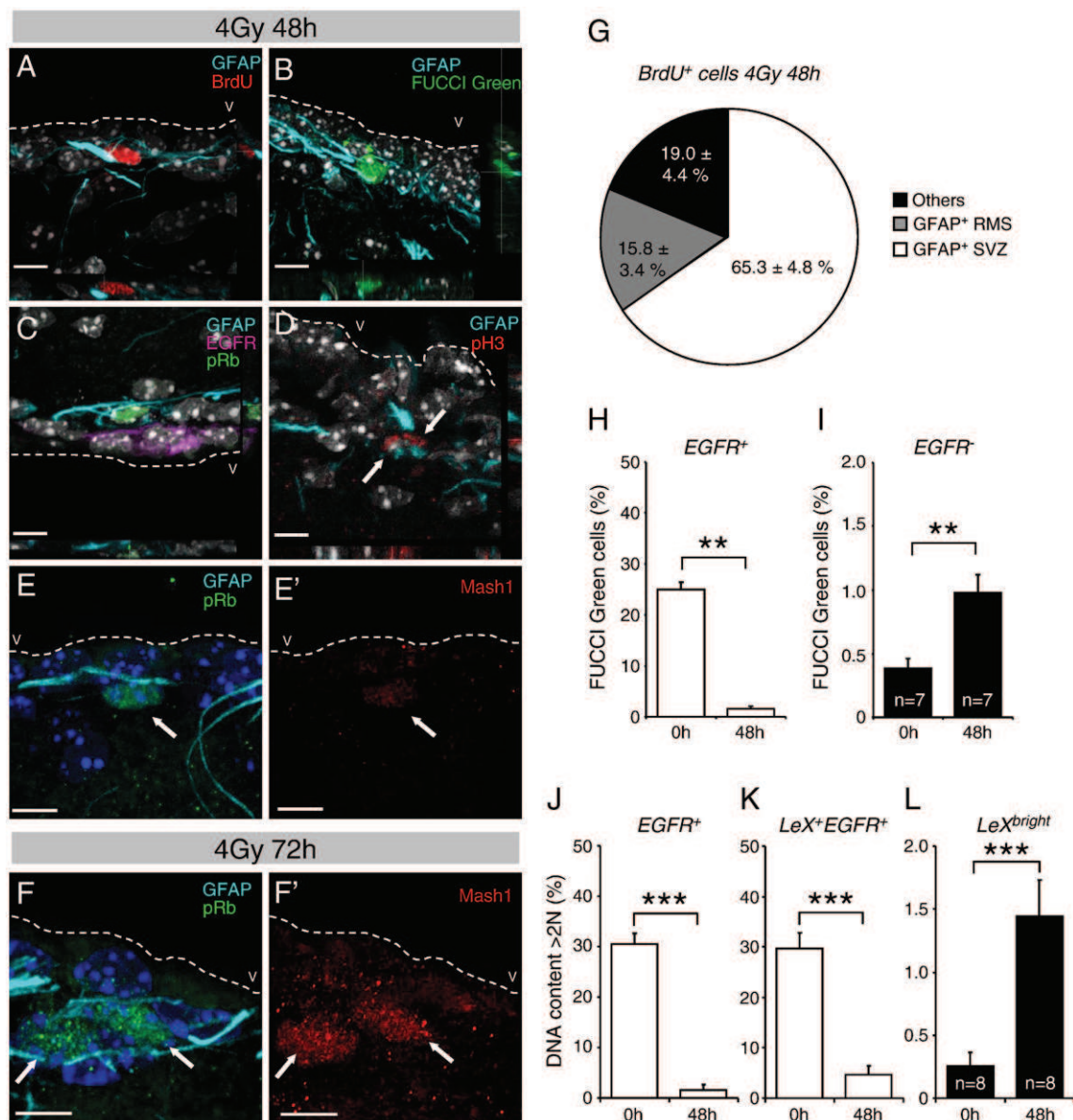


Figure 4 Quiescent NSCs enter the cell cycle 48 h after irradiation. (A–E') BrdU incorporation and positivity for Fucci green, pRb and pHistone H3 reveal that GFAP-positive cells close to the lateral ventricle have characteristics of NSCs and enter the cell cycle 48 h after irradiation, while they lack expression of EGFR and Mash1. (F–F') S-phase astrocyte-like cells express Mash1 72 h after irradiation. (G) BrdU incorporation was mainly observed in astrocyte-like cells along the SVZ at 48 h after irradiation but also in some astrocyte-like cells within the RMS. (H–L) Cells entering the S phase were examined by FACS in the different stem/progenitor populations using Fucci green-positivity or a S/G2/M DNA content. **P < 0.01, ***P < 0.001. Scale bars: 5 μm .

2012). Similarly, GABA released by neuroblasts in the SVZ exerts inhibitory control on the proliferation of astrocytic-like NSCs through GABA_AR (Liu et al., 2005). Inhibition of GABA_AR signaling by its antagonist bicuculline has been shown to stimulate the proliferation of TACs and NSCs in the SVZ (Fernando et al., 2011) but its effect on quiescent NSCs is not known. To test whether GABA_AR signaling blocks cell cycle progression of quiescent NSCs, the effects of bicuculline were examined *in vivo* in the absence of irradiation. The cell cycle distribution for LeX⁺EGFR⁺, EGFR⁺, i.e. activated NSCs and TACs, remained unaltered (Figs. 5B, C). Interestingly, the LeX^{bright} population showed an increase by 6.4-fold of proliferating cells (DNA > 2N) 24 h after bicuculline administration (Fig. 5A), consistently with the cell cycle entry of quiescent NSCs. Most certainly as a direct consequence of cell cycle entry of quiescent NSCs, the percentage of activated NSCs was increased 24 h after bicuculline treatment in non-irradiated mice (Fig. 5B'), whereas the level of TACs was not altered at that time (Fig. 5C').

Due to the death of almost all neuroblasts after irradiation (Fig. 3) the major source of GABA disappeared shortly after exposure. Thus, we explored whether the loss of GABA signals could participate in the cell cycle entry of NSCs observed after irradiation. For that purpose, muscimol, a GABA_AR agonist, or bicuculline was daily administered *in vivo* immediately after irradiation of the mice until the end of the analysis. Four days after irradiation, clusters of pRb-positive cycling cells, mostly GFAP⁺Mash1⁺ TACs, were already observed in the SVZ from non-treated irradiated mice (Figs. 5D, D'). In sharp contrast, only scattered pRb-positive cells, mostly GFAP⁺Mash1⁺ NSCs, were observed in muscimol-treated mice (Figs. 5E, E'). These observations are consistent with a muscimol-induced delay in the activation of NSCs and/or their differentiation. As there was no increase in pyknotic cells (data not shown), we ruled out the possibility that muscimol's inhibitory effect was due to cell death.

FACS analysis provided further evidence that muscimol delayed the recovery of the SVZ populations. In particular, examination of cycling SVZ cells with DNA content > 2N, showed that muscimol delayed proliferation 96 h after exposure compared to control mice and that normal proliferation was recovered after 6 days (Fig. 5F). In addition, LeX⁺EGFR⁺ (activated NSCs) and EGFR⁺ (TACs) were below the basal levels at 96 h after irradiation in muscimol-treated mice, whereas these populations had already recovered normal values in non-muscimol treated irradiated mice (Fig. 5G). Neurogenesis recovered later in muscimol-treated mice, starting 96 h after irradiation, in spite of daily administration of the drug (Figs. S7A–E), confirming that muscimol treatment only delayed the activation of quiescent NSCs but had an innocuous effect on SVZ cells afterwards. On the other hand, bicuculline administration significantly improved the recovery of LeX⁺EGFR⁺ and EGFR⁺ at 7 days after irradiation (Figs. S7G, H) and this was associated with a higher level of cycling cells in both LeX^{bright} and LeX⁺EGFR⁺ NSCs (data not shown).

Our data strongly suggest that GABA maintains NSCs in a quiescent state under physiological conditions and that loss of GABA_AR signaling following irradiation provokes quiescent NSCs to exit dormancy.

Discussion

Here, we report on a FACS method that is able to prospectively sort quiescent NSCs with a LeX^{bright} phenotype and to distinguish them from their proliferating counterparts. Using a dynamic model of neurogenic niche restoration in the adult mouse SVZ, we show that quiescent NSCs, in contrast to their proliferating counterparts, are able to resist to gamma-radiation and then enter the cell cycle rapidly after exposure, allowing efficient recovery of neurogenesis for long term. In addition, we demonstrate that the decrease in GABA_AR signaling resulting from the depletion of neuroblasts, the major GABA source in the SVZ, allowed quiescent NSCs to enter the cell cycle in the irradiated brain. Therefore, our study identifies GABA_AR signaling as a mechanism for controlling the size of the NSC niche through the regulation of NSC quiescence.

A FACS strategy to isolate quiescent NSCs

The existence of quiescent NSCs has been reported previously with the assumption that this population of NSCs resists anti-mitotic treatments (Doetsch et al., 1999b; Morshead et al., 1994). Later studies provided evidence that the majority of NSCs do not express the cycling marker Ki67, and several signaling pathways controlling quiescence have been previously revealed (Groszer et al., 2006; Kippin et al., 2005). Although the regulation of quiescence in NSCs is a central requirement for long-term neurogenesis maintenance, this population had not been isolated and its regulatory mechanisms were poorly understood. We have developed a FACS method to sort quiescent NSCs and their progeny by flow cytometry using the NSC marker LeX and the vital DNA marker Hoechst 33342, in combination with CD24 and EGFR labeling, without the need of transgenic mice.

Sorted LeX-positive cells bear typical features of astrocytes with NSC features. Indeed, they express GFAP, GLAST and TLX and line the lateral ventricle. Some LeX-positive astrocytic-like cells expressed EGFR with typical features of activated NSCs, as previously reported (Pastrana et al., 2009). The remaining LeX-positive cells negative for EGFR were contained in the LeX^{dim} population, which is mostly composed of mature astrocytes because they lack nestin expression, and in the LeX^{bright} population, which is primarily enriched in cells with the typical GFAP⁺Nestin⁺ phenotype of adult NSCs (Doetsch, 2003).

Our data draw a direct correlation between cell cycle activity and EGFR expression: actively proliferating SVZ cells are contained in the EGFR-positive populations. Moreover, the capacity to generate clones *in vitro*, both in neurospheres and in adherent cultures, was retained in the EGFR-positive populations and contained activated NSCs, TACs and young neuroblasts, in accordance with former studies (Doetsch et al., 2002; Pastrana et al., 2009).

One-third of the LeX-positive cells retained the BrdU for long-term, reminiscent of slowly dividing quiescent NSCs (Capela and Temple, 2002). By measuring DNA content, FUCCI green and the expression of cyclin mRNA, we found that the activated NSCs are enclosed in the LeX⁺EGFR⁺ population, whereas the LeX^{bright} population is supposed to contain quiescent NSCs. Although LeX^{bright} cells were unable

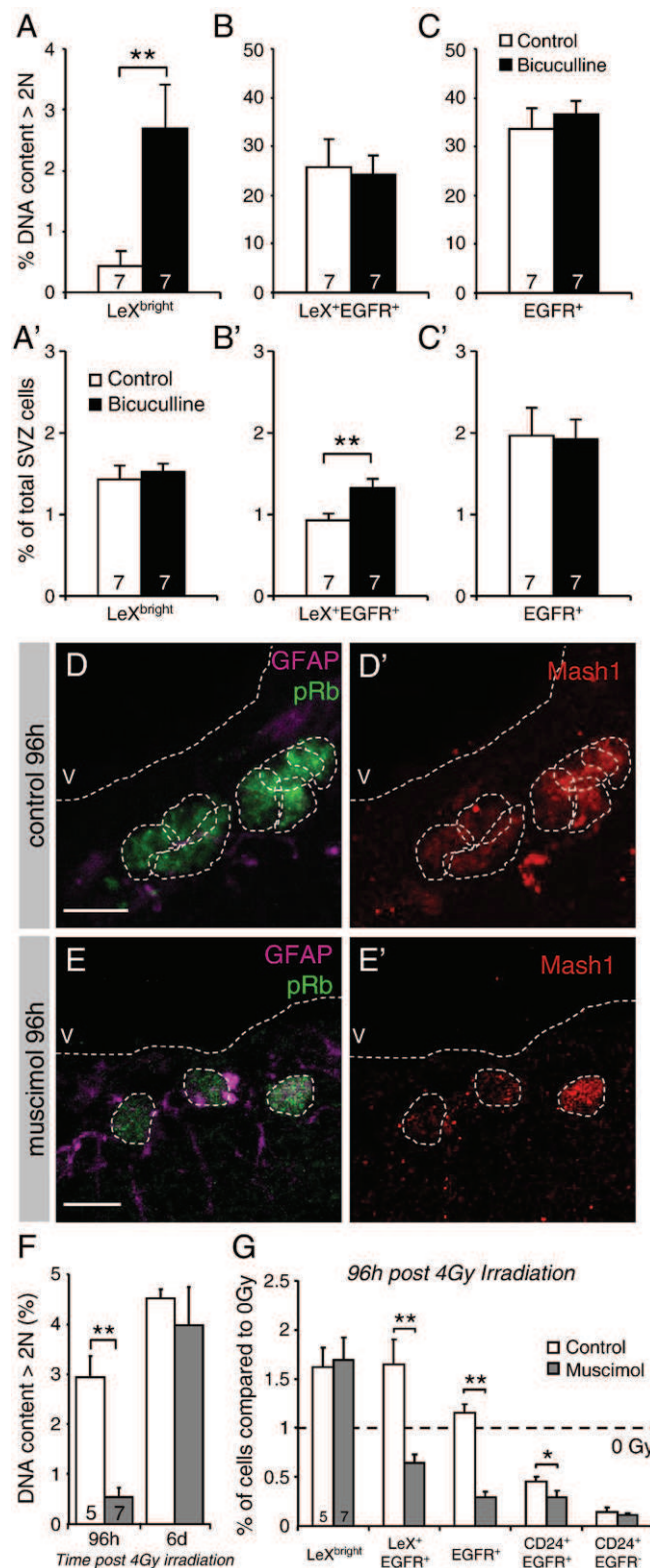


Figure 5 A GABA_AR antagonist promotes the cell cycle entry of quiescent NSCs, whereas a GABA_AR agonist delays SVZ recovery after irradiation. (A–C') Cell cycle analysis and proportion of the different stem/progenitor populations in non-irradiated mice either treated or untreated with bicuculline. (D, D') Clusters of pRb⁺ and Mash1⁺ cells were observed in irradiated control mice 96 h after exposure. (E, E') Scattered astrocyte-like cells expressing pRb and a Mash1⁺ cells in muscimol-treated mice (contours of nuclei have been drawn according to DAPI staining). (F) The DNA content of SVZ cells at 96 h and 6 days after irradiation for mice either treated or untreated with muscimol. (G) The percentage of the different stem/progenitor populations 96 h after irradiation in muscimol- and placebo-treated mice. Data were obtained with *n* mice as indicated within bars. **P* < 0.05, ***P* < 0.01. Scale bars: 5 μm.

to generate clones *in vitro*, we show that they enter the cell cycle either following irradiation or after treatment with a specific GABA_AR signaling antagonist consistently with the presence of quiescent NSCs in this population.

Therefore, our FACS strategy makes it possible, for the first time, to sort quiescent NSCs and their progeny according to their status in the cell cycle, providing an important step toward the elucidation of the mechanisms that underlie the change between quiescent and cycling populations.

Irradiation provokes cell cycle entry of quiescent NSCs

Anti-mitotic treatments, such as arabinoside cytosine and ³HTdR, eliminate cycling cells, whereas NSCs resist treatment and allow repopulation of the SVZ (Doetsch et al., 1999b; Morshead et al., 1994). Similarly, irradiation of the brain provokes the apoptosis of proliferating cells in the SVZ and, in moderate doses, proliferation restarts 2–3 days after exposure, most likely by recruiting relatively quiescent NSCs (Bellinzona et al., 1996; Shinohara et al., 1997). In agreement, we showed a spontaneous recovery of SVZ populations after exposure to 4 Gy. By contrast, exposure to 15 Gy causes a permanent inhibition of proliferation and neurogenesis in the SVZ (Lazarini et al., 2009) that is a direct consequence of the alteration of the NSC niche (Pineda et al., 2013). The great majority of cycling SVZ cells, including activated NSCs and their progeny, died shortly after radiation exposure through a p53-dependent mechanism while leaving most of the quiescent LeX^{bright} NSCs alive for long term, even after 15 Gy exposure, confirming our previous observation (Pineda et al., 2013).

Acute examination of cycling cells with different FACS/*in situ* methods (BrdU, FUCCI green, pRb) provided evidence that 48 h after 4 Gy irradiation, the majority of proliferating cells were NSCs, GFAP⁺ or LeX⁺, but negative for EGFR. Follow-up of the fate of these proliferating cells by BrdU incorporation confirmed that they give rise to neuroblasts migrating to the olfactory bulbs. Therefore, quiescent NSCs entered the S phase following irradiation and prior to the acquisition of EGFR and the expression of Mash1, revealing that EGFR signaling is not necessary for quiescent NSCs to enter the cell cycle. We propose that these cycling astrocytic-like cells that are negative for EGFR represent the earliest activation stage for quiescent NSCs.

GABA_AR signaling regulates the quiescent status of NSCs

GABA released from neuroblasts in the SVZ is involved in a feedback mechanism acting as a paracrine stop signal for neuronal proliferation (Liu et al., 2005; Nguyen et al., 2003; Wang et al., 2003); it activates GABA_AR signaling in NSCs, thereby limiting their progression through the cell cycle (Fernando et al., 2011; Liu et al., 2005). However, GABA's inhibitory mechanism is counteracted in TACs by the endogenous expression of Diazepam binding inhibitor, which favors TAC proliferation (Alfonso et al., 2012). By blocking GABA_AR signaling with the administration of bicuculline, a specific antagonist, Fernando et al. reported on the stimulation of the proliferation of NSCs *in vivo*, without

determining whether the cells were quiescent before the treatment (Fernando et al., 2011). Here, we showed that blocking GABA_AR signaling in the adult SVZ of non-irradiated mice influenced specifically the cell cycle entry of quiescent NSCs contained in the LeX^{bright} population and was associated with the increase in the level of activated NSCs but not of quiescent NSCs. These data strongly argue that the blockade of GABA_AR signaling provokes the cell cycle entry of quiescent NSCs and their subsequent asymmetric divisions.

Irradiation induces death in the majority of neuroblasts, thereby reducing the source of GABA in the SVZ. *In vivo* administration of the GABA_AR agonist muscimol after irradiation delayed both the entry of NSCs into the cell cycle and the recovery of neurogenesis. Nonetheless, the recovery of neurogenesis after irradiation was delayed but not totally blocked in the presence of muscimol, most likely due to the presence of endogenous GABA_AR inhibitory signaling (Alfonso et al., 2012) and/or the relatively short half-life of muscimol *in vivo* (Michelot and Melendez-Howell, 2003). On the other hand, blockade of GABA_AR signaling with bicuculline increased the cell cycle entry of NSCs after irradiation and the resulting recovery of activated NSCs and TACs but had no effect on the recovery of neuroblasts. Thus, bicuculline might be used as mitigator to stimulate early neurogenesis after radiation exposure but should be combined with factor(s) favoring neuronal differentiation to foster the repopulation of the SVZ.

Our data demonstrate that the loss of GABA_AR signaling in quiescent NSCs provokes their entry into the cell cycle. We propose that this signaling may regulate the size of the SVZ niche. When the SVZ niche contains a sufficient number of neuroblasts, NSCs are maintained in a quiescent state, whereas they enter the cell cycle to replenish the niche when neuroblasts are lost. One might envision that similar regulatory mechanisms apply also for the NSCs in the SGZ of the hippocampus. Indeed, a similar effect of irradiation on cell death, proliferation and neurogenesis recovery has also been reported in the SGZ following 4 Gy exposure that is the same dose that we used in the present study (Ben Abdallah et al., 2007). Moreover, it has been recently shown that NSCs in the hippocampus respond tonically to GABA released by interneurons and exit from quiescence after conditional deletion of GABA receptor (Song et al., 2012). These data highlight the importance of drugs targeting GABA_AR signaling in adult quiescent NSC cell-cycle entry and provide an attractive approach for the development of regenerative therapies based on stimulating endogenous neurogenesis. They are also particularly relevant because many drugs that are used clinically to treat anxiety or epilepsy operate by targeting GABA_AR signaling.

Conclusions

Our sorting technique, combined with the model of neurogenesis recovery after irradiation, should prove useful for the elucidation of the molecular mechanisms that regulate the balance between quiescent and activated NSCs. In addition, we have shown that it is feasible to stimulate early phases of neurogenesis by recruiting endogenous quiescent NSCs after radiation injury.

Author contributions

Mathieu Daynac: Collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing.

Alexandra Chicheportiche: Collection and/or assembly of data.

José R Pineda: Collection and/or assembly of data.

Laurent R Gauthier: Collection and/or assembly of data.

François D Boussin: Supervision of the study, financial support, and manuscript writing.

Marc-André Mouthon: Supervision of the study, conception and design, data analysis and interpretation, manuscript writing, and final approval of the manuscript.

Acknowledgments

We are indebted to JB Lahaye for irradiation, to O Etienne for his help, to C Joubert, V Neuville and all the staff of animal facilities; to I Baier, N Dechamps, and H Benjelloun for cell sorting, to T Kortulewski for the imaging facility and to S Moreno and I Allemand for p53 deficient mice.

M.D. has a fellowship from La Ligue Contre le Cancer and J.R.P. from Région Ile-de-France (DIM STEM-Pôle). This work was supported by grants of ANR-SEST (Neurorad), INCA (Tetratips) and Electricité de France (EDF). The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.scr.2013.02.008>.

References

- Alfonso, J., Le Magueresse, C., Zuccotti, A., Khodosevich, K., Monyer, H., 2012. Diazepam binding inhibitor promotes progenitor proliferation in the postnatal SVZ by reducing GABA signaling. *Cell Stem Cell* 10 (1), 76–87.
- Bellinzona, M., Gobbel, G.T., Shinohara, C., Fike, J.R., 1996. Apoptosis is induced in the subependyma of young adult rats by ionizing irradiation. *Neurosci. Lett.* 208 (3), 163–166.
- Ben Abdallah, N.M., Slomianka, L., Lipp, H.P., 2007. Reversible effect of X-irradiation on proliferation, neurogenesis, and cell death in the dentate gyrus of adult mice. *Hippocampus* 17 (12), 1230–1240. <http://dx.doi.org/10.1002/hipo.20358>.
- Brown, J.P., Couillard-Despres, S., Cooper-Kuhn, C.M., Winkler, J., Aigner, L., Kuhn, H.G., 2003. Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J. Comp. Neurol.* 467 (1), 1–10.
- Calaora, V., Chazal, G., Nielsen, P.J., Rougon, G., Moreau, H., 1996. mCD24 expression in the developing mouse brain and in zones of secondary neurogenesis in the adult. *Neuroscience* 73 (2), 581–594.
- Capela, A., Temple, S., 2002. LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal. *Neuron* 35 (5), 865–875.
- Carlen, M., Meletis, K., Goritz, C., Darsalia, V., Evergren, E., et al., 2009. Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke. *Nat. Neurosci.* 12 (3), 259–267.
- Chevalier, F., Chicheportiche, A., Daynac, M., Depagne, J., Bertrand, P., Boussin, F.D., et al., 2012. Identification of factors involved in neurogenesis recovery after irradiation of the adult mouse subventricular zone: a preliminary study. In: Man, T.K., Flores, R.J. (Eds.), *Proteomics – Human Diseases and Protein Functions*, vol. 1. InTech, Rijeka, pp. 327–346.
- Chow, B.M., Li, Y.Q., Wong, C.S., 2000. Radiation-induced apoptosis in the adult central nervous system is p53-dependent. *Cell Death Differ.* 7 (8), 712–720.
- Costa, M.R., Ortega, F., Brill, M.S., Beckervordersandforth, R., Petrone, C., Schroeder, T., et al., 2011. Continuous live imaging of adult neural stem cell division and lineage progression in vitro. *Development* 138 (6), 1057–1068.
- Doetsch, F., 2003. The glial identity of neural stem cells. *Nat. Neurosci.* 6 (11), 1127–1134.
- Doetsch, F., Caille, I., Lim, D.A., Garcia-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A., 1999a. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97 (6), 703–716.
- Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A., 1999b. Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (20), 11619–11624.
- Doetsch, F., Petreanu, L., Caille, I., Garcia-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A., 2002. EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* 36 (6), 1021–1034.
- Fernando, R.N., Eleuteri, B., Abdelhady, S., Nussenzweig, A., Andang, M., Ernfors, P., 2011. Cell cycle restriction by histone H2AX limits proliferation of adult neural stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (14), 5837–5842.
- Garcia, A.D., Doan, N.B., Imura, T., Bush, T.G., Sofroniew, M.V., 2004. GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat. Neurosci.* 7 (11), 1233–1241.
- Groszer, M., Erickson, R., Scripture-Adams, D.D., Dougherty, J.D., Le Belle, J., Zack, J.A., et al., 2006. PTEN negatively regulates neural stem cell self-renewal by modulating G0–G1 cell cycle entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (1), 111–116.
- Haydar, T.F., Wang, F., Schwartz, M.L., Rakic, P., 2000. Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones. *J. Neurosci.* 20 (15), 5764–5774.
- Kippin, T.E., Martens, D.J., van der Kooy, D., 2005. p21 loss compromises the relative quiescence of forebrain stem cell proliferation leading to exhaustion of their proliferation capacity. *Genes Dev.* 19 (6), 756–767.
- Lazarini, F., Mouthon, M.A., Gheusi, G., de Chaumont, F., Olivo-Marin, J.C., Lamarque, S., et al., 2009. Cellular and behavioral effects of cranial irradiation of the subventricular zone in adult mice. *PLoS One* 4 (9), e7017.
- Liu, X., Wang, Q., Haydar, T.F., Bordey, A., 2005. Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nat. Neurosci.* 8 (9), 1179–1187.
- Lois, C., Garcia-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A., 1996. Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271 (5251), 978–981.
- LoTurco, J.J., Owens, D.F., Heath, M.J., Davis, M.B., Kriegstein, A.R., 1995. GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron* 15 (6), 1287–1298.
- Michelot, D., Melendez-Howell, L.M., 2003. *Amanita muscaria*: chemistry, biology, toxicology, and ethnomycology. *Micol. Res.* 107 (Pt 2), 131–146.
- Mori, T., Tanaka, K., Buffo, A., Wurst, W., Kuhn, R., Gotz, M., 2006. Inducible gene deletion in astroglia and radial glia – a valuable tool for functional and lineage analysis. *Glia* 54 (1), 21–34.
- Morshead, C.M., Reynolds, B.A., Craig, C.G., McBurney, M.W., Staines, W.A., Morassutti, D., et al., 1994. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 13 (5), 1071–1082.
- Mouthon, M.-A., Fouchet, P., Mathieu, C., Sii-Felice, K., Etienne, O., et al., 2006. Neural stem cells from mouse forebrain are contained in a population distinct from the ‘side population’. *J. Neurochem.* 99 (3), 807–817.

- Nguyen, L., Malgrange, B., Breuskin, I., Bettendorff, L., Moonen, G., et al., 2003. Autocrine/paracrine activation of the GABA(A) receptor inhibits the proliferation of neurogenic polysialylated neural cell adhesion molecule-positive (PSA-NCAM+) precursor cells from postnatal striatum. *J. Neurosci.* 23 (8), 3278–3294.
- Obermair, F.J., Fiorelli, R., Schroeter, A., Beyeler, S., Blatti, C., et al., 2010. A novel classification of quiescent and transit amplifying adult neural stem cells by surface and metabolic markers permits a defined simultaneous isolation. *Stem Cell Res.* 5 (2), 131–143.
- Parras, C.M., Galli, R., Britz, O., Soares, S., Galichet, C., Battiste, J., et al., 2004. Mash1 specifies neurons and oligodendrocytes in the postnatal brain. *EMBO J.* 23 (22), 4495–4505.
- Pastrana, E., Cheng, L.C., Doetsch, F., 2009. Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (15), 6387–6392.
- Pineda, J.R., Daynac, M., Chicheportiche, A., Cebrian-Silla, A., Sii-Felice, K., Garcia-Verdugo, J.-M., et al., 2013. Vascular-derived TGF- β increases in stem cell niche and perturbs neurogenesis during aging and irradiation in the adult mouse brain. *EMBO Mol. Med.* <http://dx.doi.org/10.1002/emmm.201202197>.
- Platel, J.C., Stambouliau, S., Nguyen, I., Bordey, A., 2010. Neurotransmitter signaling in postnatal neurogenesis: the first leg. *Brain Res. Rev.* 63 (1–2), 60–71.
- Ren, S., Rollins, B.J., 2004. Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. *Cell* 117 (2), 239–251.
- Sakaue-Sawano, A., Kurokawa, H., Morimura, T., Hanyu, A., Hama, H., Osawa, H., et al., 2008. Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell* 132 (3), 487–498.
- Shinohara, C., Gobbel, G.T., Lamborn, K.R., Tada, E., Fike, J.R., 1997. Apoptosis in the subependyma of young adult rats after single and fractionated doses of X-rays. *Cancer Res.* 57 (13), 2694–2702.
- Sii-Felice, K., Etienne, O., Hoffschir, F., Mathieu, C., Riou, L., Barroca, V., et al., 2008. Fanconi DNA repair pathway is required for survival and long-term maintenance of neural progenitors. *EMBO J.* 27 (5), 770–781.
- Song, J., Zhong, C., Bonaguidi, M.A., Sun, G.J., Hsu, D., Gu, Y., et al., 2012. Neuronal circuitry mechanism regulating adult quiescent neural stem-cell fate decision. *Nature*. <http://dx.doi.org/10.1038/nature11306>.
- Tada, E., Yang, C., Gobbel, G.T., Lamborn, K.R., Fike, J.R., 1999. Long-term impairment of subependymal repopulation following damage by ionizing irradiation. *Exp. Neurol.* 160 (1), 66–77.
- Wang, D.D., Krueger, D.D., Bordey, A., 2003. GABA depolarizes neuronal progenitors of the postnatal subventricular zone via GABAA receptor activation. *J. Physiol.* 550 (Pt 3), 785–800.

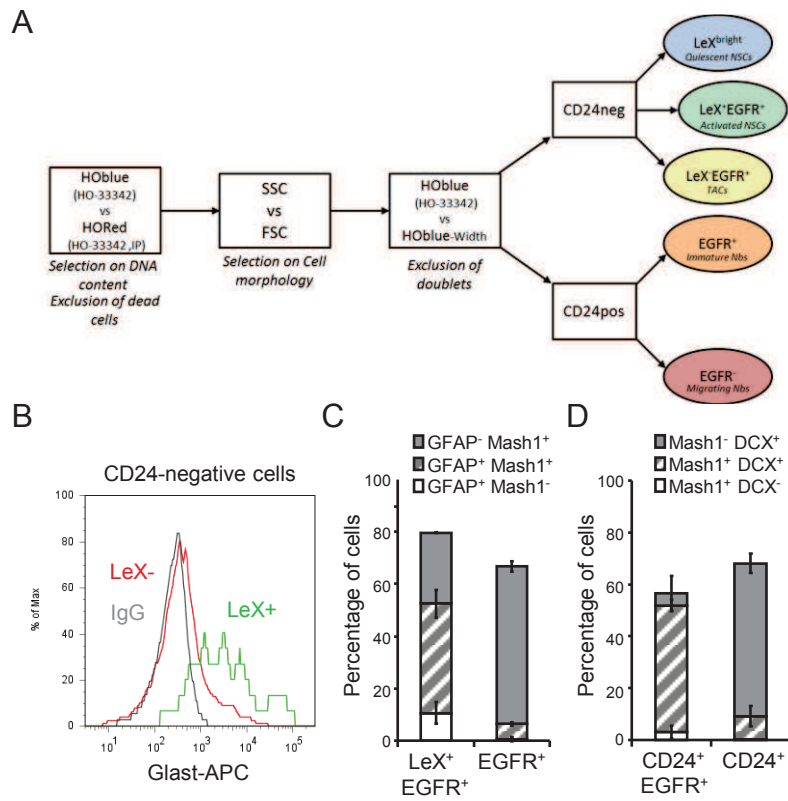


Figure S1

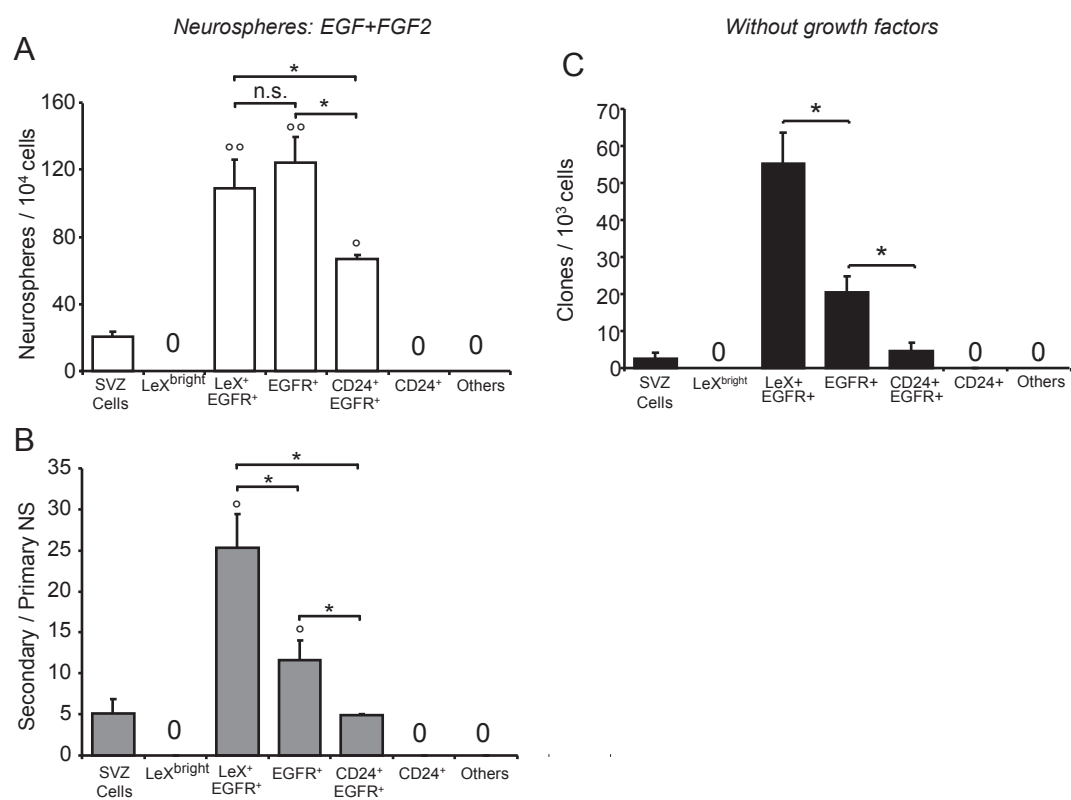


Figure S2

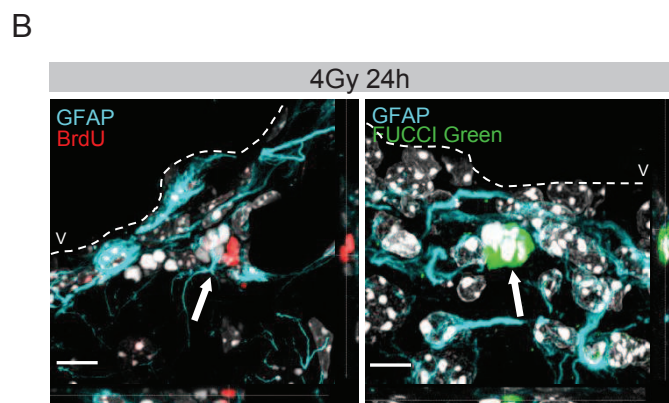
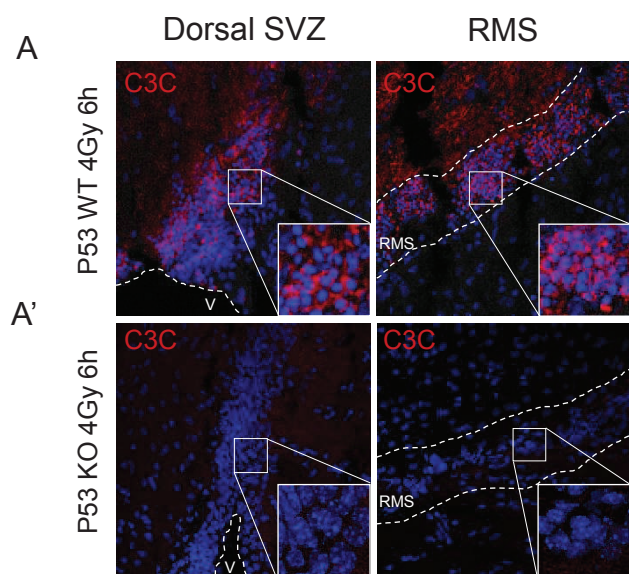


Figure S3

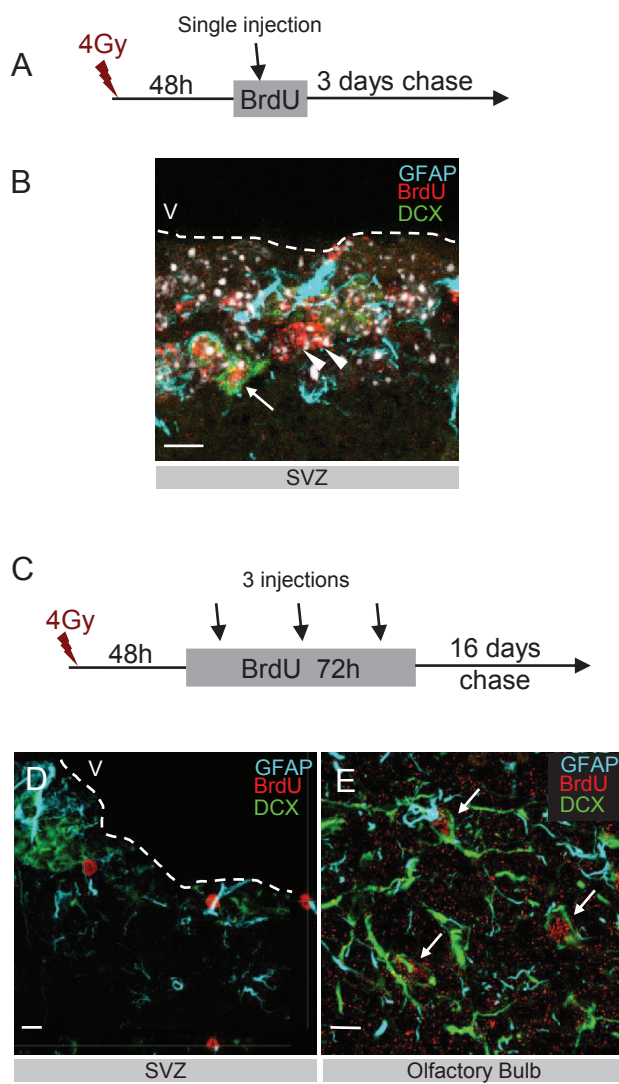


Figure S4

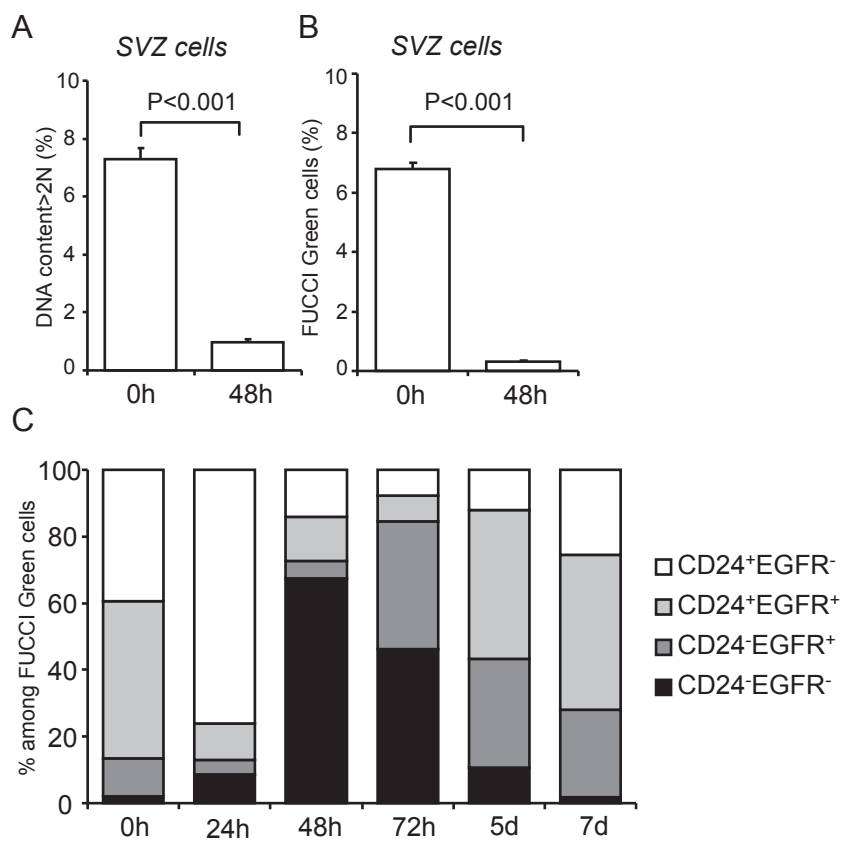


Figure S5

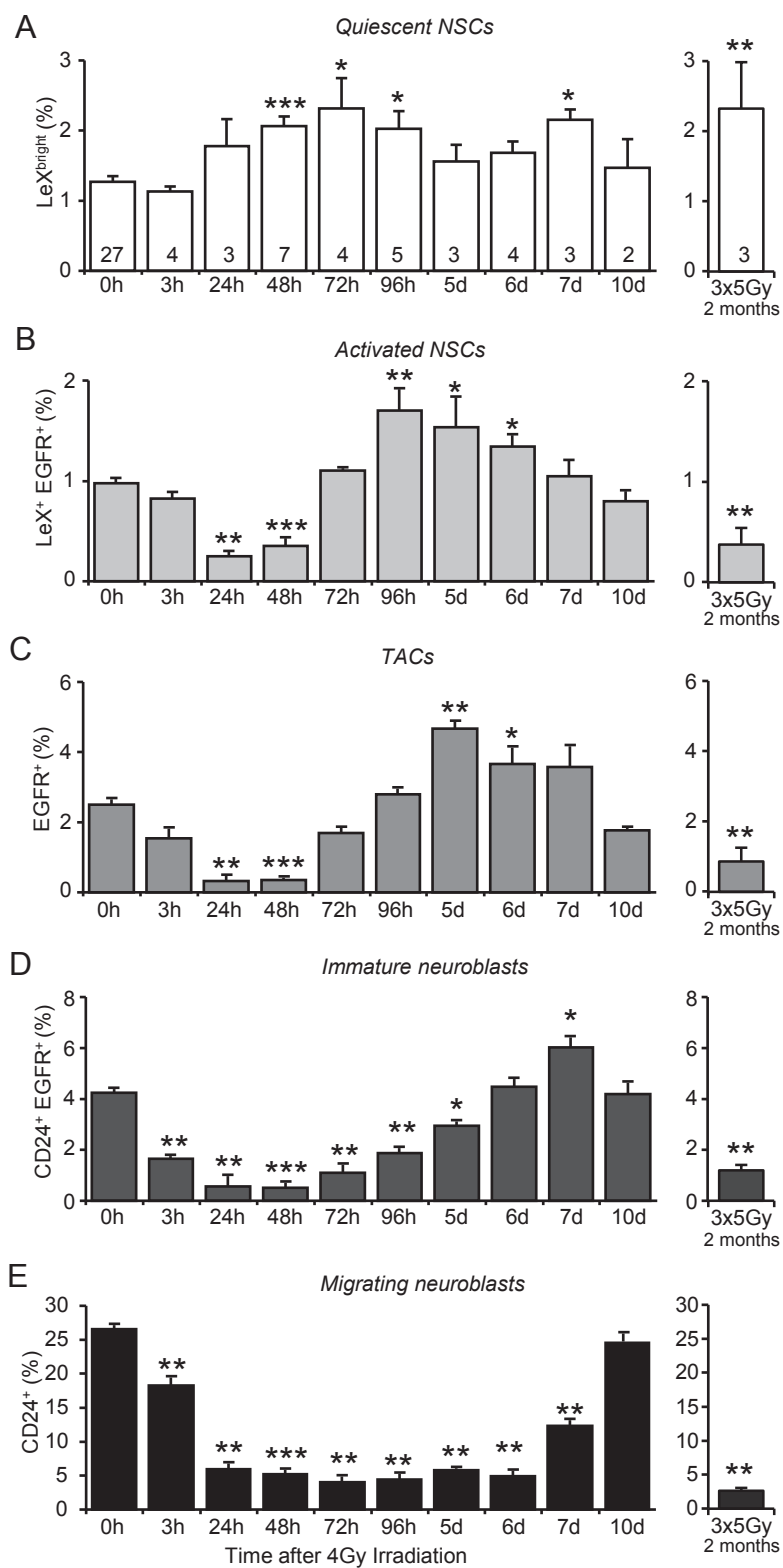


Figure S6

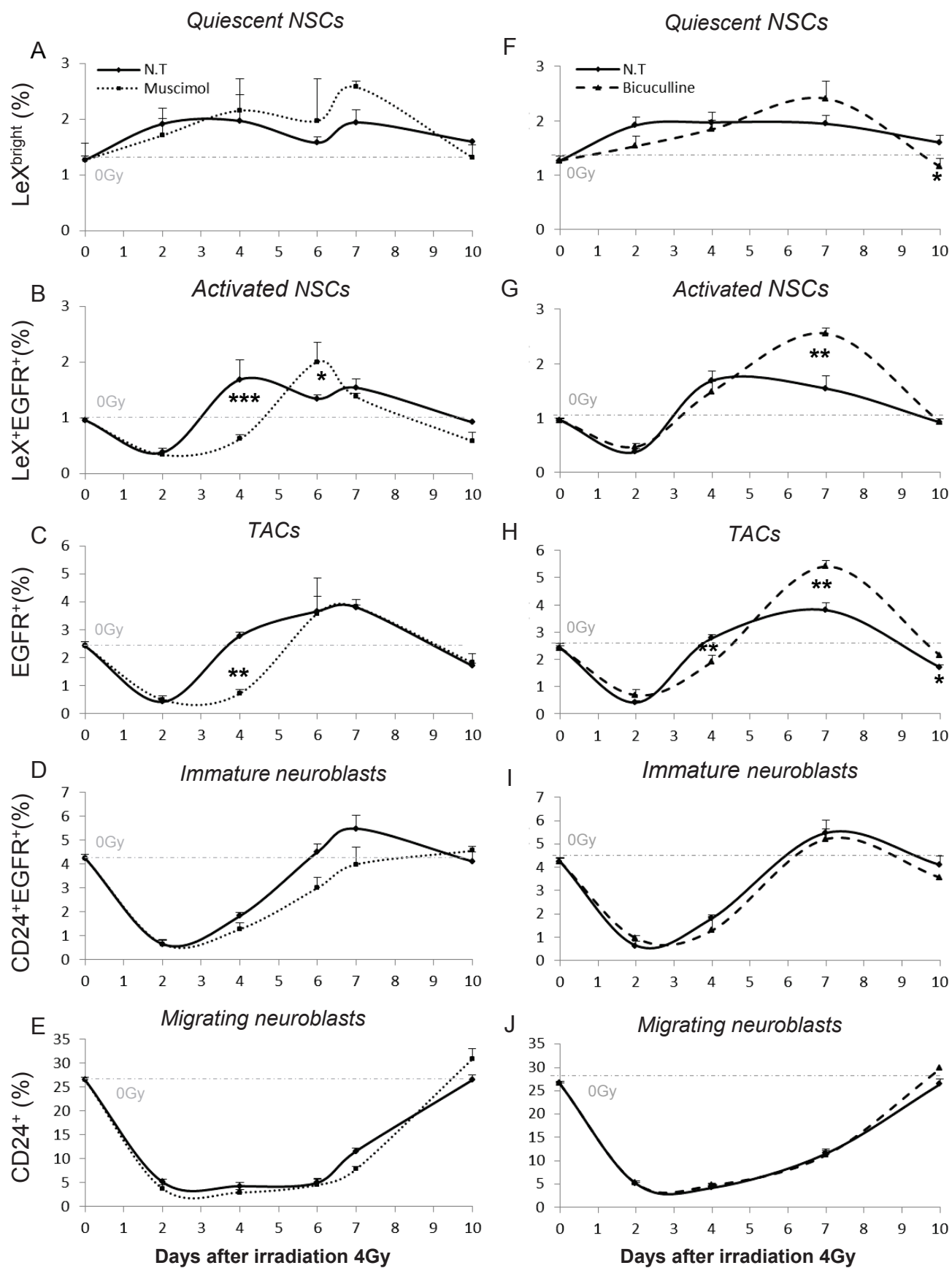


Figure S7

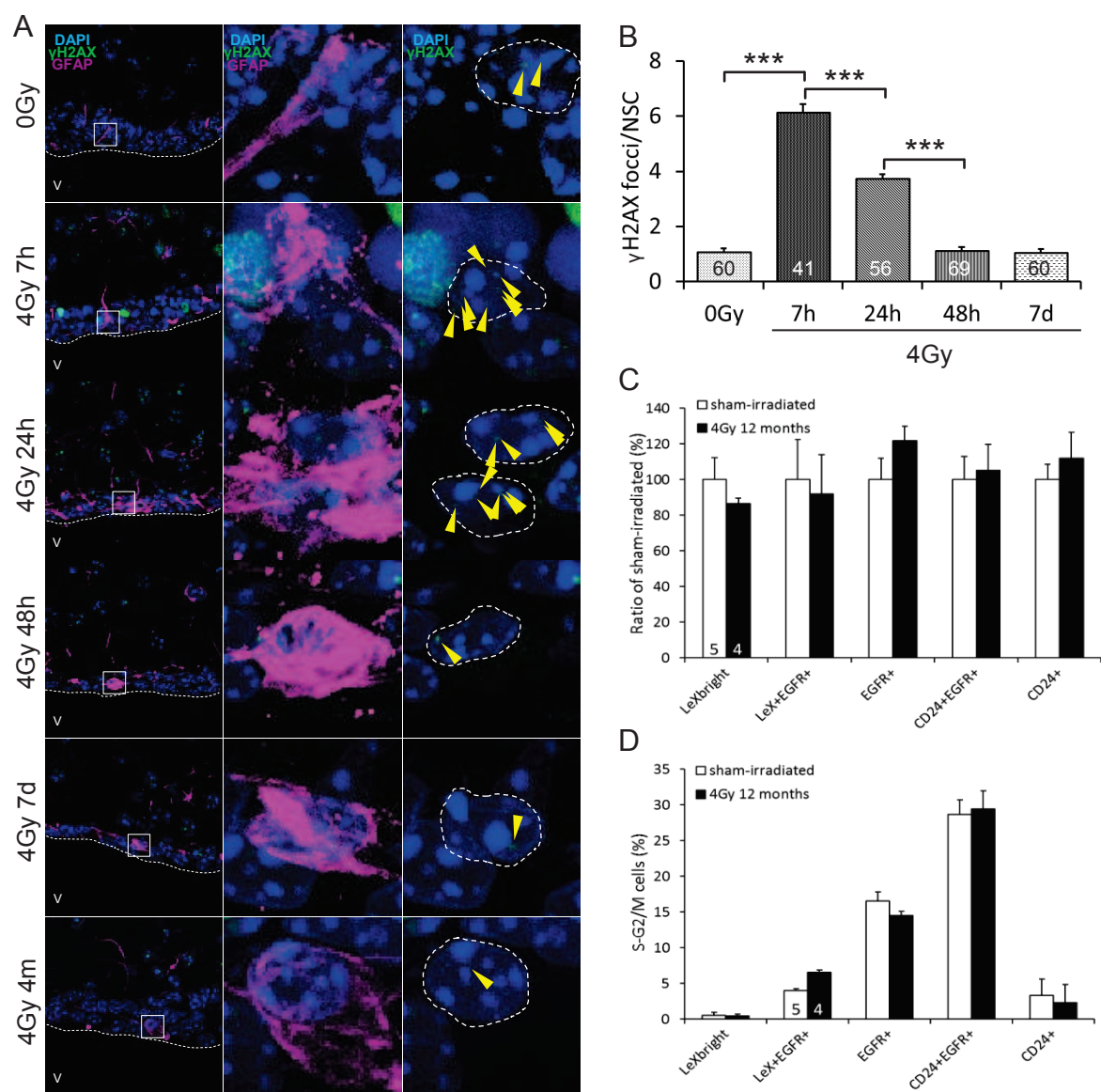


Figure S8

Supplemental Figure legends

Figure S1: LeX-positive cells have characteristics of NSCs

(A) Flow chart explaining how to select the five main populations selected during FACS and characterized in this study. (B) GLAST is expressed on CD24⁻LeX⁺ cells which confirm their astrocytic-like phenotype. (C and D) Immunophenotyping of FACS-sorted SVZ populations using GFAP/Mash1 and Mash1/DCX double staining.

Figure S2: Neurosphere formation by FACS-sorted SVZ populations

(A) The number of primary neurospheres was counted 7 days after plating sorted cells in the presence of EGF and FGF2. (B) Formation of secondary neurospheres was determined and represented as the ratio of secondary/primary neurospheres. (C) Formation of clones was examined 7 days after sorting on poly-D-lysine adherent cultures without added growth factors. Data are represented as the mean \pm SD obtained in 4 independent sorts. Statistical comparisons between different sorted groups * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and compared to total SVZ cells. ° $p < 0.05$, °° $p < 0.01$.

Figure S3: Cell death in the SVZ short term after irradiation

Apoptosis (cleaved caspase 3 and pyknotic nuclei) were observed 6h after exposure to 4Gy in the SVZ and in the RMS in wild type mice (A) whereas it was absent in p53-deficient mice (A'). (B) Pyknotic nuclei (arrows) were still seen 24h after irradiation along the ventricle in BrdU- and Fucci green-positive cells.

Figure S4: Early proliferating cells following exposure give rise to neuroblasts and retained BrdU for long term

(A, C) Experimental schedules for injection of BrdU in irradiated mice and chase before SVZ immunostaining. (B) Cells that had incorporated BrdU at 48h gave rise to a progeny of GFAP and Dcx double negative cells, possibly TACs (arrowheads in B) and to some Dcx-positive neuroblasts in the SVZ (arrow in B). After 16 days of BrdU chase, long-term BrdU retaining cells are observed along the ventricle and express GFAP (D) and BrdU⁺Dcx⁺ neuroblasts are observed in the olfactory bulbs (arrows in E). Scale bar: 5µm.

Figure S5: Cycling cells after irradiation in the SVZ

(A-B) Proliferation of SVZ cells was determined by DNA content >2N and FUCCI green-positivity before and 48h after irradiation. (C) The repartition of FUCCI green⁺ cells shows that most of proliferating cells were CD24⁻EGFR⁻ double negative 48h after exposure. *** p<0.001.

Figure S6: Recovery of SVZ populations following irradiation

(A-E) Percentages of SVZ populations are shown different times after a 4Gy irradiation and 2 months after a 3x5Gy irradiation. Data are represented as the mean ± SD obtained with n mice as indicated within the bars. Statistical analyses were performed as compared to before irradiation. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

Figure S7: Muscimol treatment delays SVZ neurogenesis after irradiation while bicuculline treatment accelerates SVZ repopulation.

(A-E) Bicuculline treatment improved neurogenesis recovery 7 days after irradiation. (F-J) Muscimol treated mice recovered later in comparison to control mice.

Data are represented as the mean \pm SD obtained with 2-7 mice. Statistical analyses were performed as compared to before irradiation. Statistical analyses were performed by comparison between muscimol treated and control groups. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure S8: Radioresistant quiescent NSCs efficiently repair their DNA damages and allow repopulation of the SVZ for long term.

(A,B) Number of γ H2AX foci in GFAP-positive cells lining the lateral ventricle counted *in situ* is back to normal 48h after irradiation. Yellow arrowheads represent γ H2AX foci inside NSCs nucleus. Data are represented as the mean \pm SD obtained with 2 mice on the number of GFAP NSCs indicated within the bars. (C,D) Long term effects (12 months after exposure) of 4 Gy irradiation on the SVZ cell populations seem innocuous as no differences were observed between irradiated mice and age matched controls for the percentage of all SVZ populations nor their proliferation status (% of S-G2/M). Data are represented as the mean \pm SD obtained with n mice as indicated within the bars. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

ARTICLE 3 :

Vascular-derived TGF- β increases in the stem cell niche and perturbs neurogenesis during aging and following irradiation in the adult mouse brain

Jose R. Pineda, Mathieu Daynac, Alexandra Chicheportiche, Arantxa Cebrian-Silla, Karine Sii Felice, Jose Manuel Garcia-Verdugo, Francois D. Boussin, Marc-André Mouthon

Nous nous sommes ensuite intéressé au devenir des CSN lors du vieillissement des niches neurogéniques ou après exposition à de fortes doses d'irradiation. Le vieillissement physiologique des niches neurogenique est associé à une réduction progressive des cellules en prolifération et des neuroblastes dans la ZSV et les bulbes olfactifs des rongeurs (Enwere et al., 2004) (Tropepe et al., 1997). L'irradiation provoque l'apoptose de cellules en prolifération dans la ZSV et une perturbation dose-dépendante de la neurogenèse pour des doses excédant 10 Gy chez les rongeurs (Tada et al., 1999). Dans les deux cas, on observe une survie des CSNs mais elles semblent perdre leur capacité à produire des nouveaux neurones et/ou à s'auto-renouveler (Achanta et al., 2012) (Sii-Felice et al., 2008).

Nous avons donc essayé de déterminer les mécanismes responsables du déclin de la neurogenèse avec le vieillissement ou après irradiation.

Avec la méthode de tri cellulaire des populations de la ZSV par FACS mise au point dans l'article n°2 (Daynac et al., 2013), nous avons pu confirmer que :

- La proportion de CSN activées LeX+EGFR+ reste inchangée entre la ZSV de souris de 2 mois, la ZSV de souris de 2 mois irradiées 3x5Gy et la ZSV de souris de 12 mois.
- En revanche, comme attendu, la proportion de cellules de type C LeX-EGFR+ et de neuroblastes CD24+ diminue sensiblement dans la ZSV irradiée et âgée.

Ainsi, le déclin de la neurogenèse associé au vieillissement et à l'irradiation ne viendrait pas directement d'une perte intrinsèque du nombre de CSN mais pourrait en revanche être associé à une altération de leur microenvironnement. Lorsque l'on greffe des cellules immatures de la ZSV de souris GFP près du ventricule d'une souris témoin ou d'une souris irradiée 3 x 5Gy, on observe :

- Dans les deux cas une prise de greffe et la formation d'une nouvelle niche neurogénique où les CSN greffées parviennent à contacter les vaisseaux sanguins.

- En revanche, contrairement aux cellules greffées dans la souris témoin, les cellules greffées dans l'environnement irradié n'expriment pas le ki-67 et n'incorporent pas le BrdU.

Ceci montre que la modification du microenvironnement après irradiation est directement responsable de l'inhibition de la prolifération des CSN, ce qui suppose que des facteurs produits par le microenvironnement pourraient perturber le cycle des CSN. Le niveau de la cytokine anti-mitotique TGF β 1 augmente fortement et rapidement après différents type de lésions cérébrales (Gomes et al., 2005), et le TGF- β 1 est surexprimé dans le cerveau au cours du vieillissement (Werry et al., 2010). Des études menées sur des cerveaux humains de différents âges ont utilisé des tests ELISAs pour évaluer les changements d'expression de différents facteurs pouvant être reliés à la régulation de la prolifération au cours de la vie adulte (18-104 ans) (Werry et al., 2010). Ainsi, l'augmentation de l'expression de TGF β 1 dans les niches neurogéniques avec le vieillissement pourrait être un des facteurs responsable de la diminution de la neurogenèse.

Nous avons observé :

- Une augmentation de TGF- β 1 associé aux cellules endothéliales spécifiquement dans les ZSV irradiées et âgées.
- L'expression des récepteurs T β RI et T β RII sur les CSN et les TAC.
- Une activation de la voie TGF β /Smad3 dans la majorité des cellules des ZSV irradiées et âgées.

Ces résultats montrent que les cellules endothéliales de la ZSV produisent du TGF- β 1 dans le cerveau irradié et âgé et activent la voie TGF β /Smad3 dans les CSN et les TAC. Nous avons aussi montré *in vitro* que l'ajout de TGF- β 1 réduisait la taille des neurosphères produites par les CSN activées et TAC, montrant l'impact du TGF- β 1 sur l'inhibition de la prolifération. Pour essayer de rétablir la prolifération dans le cerveau âgé et irradié, nous avons ensuite entrepris un blocage pharmacologique de la voie TGF- β *in vivo* :

- Le blocage de la voie TGF- β par une administration intraveineuse d'anticorps bloquants anti TGF- β ou par une administration intranasale de la drogue

synthétique SB-505124 augmente le nombre de cellules BrdU+ dans la ZSV et le RMS des souris irradiées et âgées, sans affecter la prolifération dans la ZSV des souris jeunes.

- De plus, l'administration de SB-505124 induit une prolifération des CSN CD24-Glast+ dans le cerveau irradié et âgé.

Ainsi, le blocage de la voie TGF- β permet le rétablissement de la neurogenèse dans le cerveau murin âgé ainsi que dans le cerveau irradié. Ce dernier résultat pourrait être d'importance pour le traitement des patients cancéreux traités par radiothérapie crânienne.

Vascular-derived TGF- β increases in the stem cell niche and perturbs neurogenesis during aging and following irradiation in the adult mouse brain

Jose R. Pineda^{1,2,3,4}, Mathieu Daynac^{1,2,3,4}, Alexandra Chicheportiche^{1,2,3,4}, Arantxa Cebrian-Silla⁵, Karine Sii Felice^{1,2,3,4}, Jose Manuel Garcia-Verdugo⁵, François D. Boussin^{1,2,3,4*†}, Marc-André Mouthon^{1,2,3,4*†}

Keywords: aging; endothelial cells; irradiation; neural stem cells; TGF-beta

DOI 10.1002/emmm.201202197

Received October 22, 2012

Revised December 18, 2012

Accepted December 20, 2012

Neurogenesis decreases during aging and following cranial radiotherapy, causing a progressive cognitive decline that is currently untreatable. However, functional neural stem cells remained present in the subventricular zone of high dose-irradiated and aged mouse brains. We therefore investigated whether alterations in the neurogenic niches are perhaps responsible for the neurogenesis decline. This hypothesis was supported by the absence of proliferation of neural stem cells that were engrafted into the vascular niches of irradiated host brains. Moreover, we observed a marked increase in TGF- β 1 production by endothelial cells in the stem cell niche in both middle-aged and irradiated mice. In co-cultures, irradiated brain endothelial cells induced the apoptosis of neural stem/progenitor cells via TGF- β /Smad3 signalling. Strikingly, the blockade of TGF- β signalling *in vivo* using a neutralizing antibody or the selective inhibitor SB-505124 significantly improved neurogenesis in aged and irradiated mice, prevented apoptosis and increased the proliferation of neural stem/progenitor cells. These findings suggest that anti-TGF- β -based therapy may be used for future interventions to prevent neurogenic collapse following radiotherapy or during aging.

INTRODUCTION

Decreased adult neurogenesis following cranial irradiation, which is a central adjuvant treatment for brain tumours in both paediatric and adult patients, is believed to contribute to

cognitive decline (Monje & Palmer, 2003). We and others have reported that exposure of the brain to 15 Gy is accompanied by the perturbation of olfactory memory and is associated with decreased neurogenesis in mice (Lazarini et al, 2009; Valley et al, 2009).

Neural stem cells (NSCs) are located in the adult subventricular zone (SVZ) and are involved in neurogenesis during adulthood (Doetsch et al, 1999). Adult NSCs successively give rise to transit amplifying progenitors (TAPs) and then to neuroblasts, which migrate in chains to the olfactory bulbs (OBs), where they differentiate into neurons (Alvarez-Buylla & Lim, 2004). Dividing NSCs and TAPs establish intimate interactions with blood vessels at sites that lack pericyte coverage to form vascular niches within the adult SVZ (Mirzadeh et al, 2008; Shen et al, 2008; Tavazoie et al, 2008). Increasing evidence has revealed the importance of growth factors that are synthesized by brain endothelial cells (BECs) of

(1) CEA DSV iRCM SCSR, Laboratoire de Radiopathologie, Fontenay-aux-Roses, France

(2) INSERM, U967, Fontenay-aux-Roses, France

(3) Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, UMR 967, Fontenay-aux-Roses, France

(4) Université Paris Sud, UMR 967, Fontenay-aux-Roses, France

(5) Laboratorio de Neurobiología Comparada, Instituto Cavanilles, Universidad de Valencia, Valencia, CIBERNED, Spain

*Corresponding authors: Tel: +33 1 46 54 94 61; Fax: +33 1 46 54 91 80; E-mail: boussin@cea.fr; marc-andre.mouthon@cea.fr

†These authors contributed equally to this work.

the vascular niche in the regulation of neurogenesis, including NSC proliferation (Ramirez-Castillejo et al, 2006). Moreover, molecular cross-talk between NSCs and BECs includes signals that act on both cell types. These signals include members of the vascular endothelial growth factor family (Calvo et al, 2011).

Irradiation provokes apoptosis in proliferating cells in the SVZ and a clear dose-dependent impairment of neurogenesis that is permanent for doses exceeding 10 Gy in rodents (Tada et al, 1999). Whereas some NSCs have been reported to survive after 10 Gy irradiation, they lack the ability to give rise to new neurons (Achanta et al, 2012). Apart from a reduction in the number of resident NSCs, irradiation may also generate a hostile microenvironment. In particular, this treatment may lessen NSC proliferation and differentiation *in vivo*. Indeed, microglial inflammation that accompanies radiation injury has been implicated in neurogenic collapse and NSC dysfunction in the hippocampus (Monje et al, 2003); however, the mechanisms of neurogenesis alteration in the SVZ remain elusive.

Studies indicate that physiological aging is also associated with a progressive reduction in proliferating cells and in doublecortin-positive neuroblasts in the SVZ and OBs of rodents (Enwere et al, 2004; Maslov et al, 2004; Tropepe et al, 1997). A significant decline in neural stem/progenitor cells is apparent by 6 months of age in the SVZ, ultimately resulting in a dramatic reduction in the number of these cells in elderly mice (Enwere et al, 2004). A premature decrease in the NSC pool owing to aging suggests that these NSCs have no self-renewal capacity and/or are programmed to complete only a limited number of divisions (Sii-Felice et al, 2008). However, when the SVZ from aged mice were cultured *in vitro*, NSCs retain their capacity to proliferate and to differentiate into functional neurons, similar to the NSCs in young adult mice, albeit with lower efficiency (Ahlenius et al, 2009; Tropepe et al, 1997). Furthermore, the neurogenesis decline that is observed during ageing in the hippocampus has been attributed in part to changes in the systemic milieu (Villeda et al, 2011).

TGF- β has been widely recognized as an injury-related cytokine, as its levels are strongly and rapidly upregulated in the brain following different forms of injuries (Gomes et al, 2005) and during aging (Werry et al, 2010). The chronic elevation of TGF- β 1 triggers accumulation of basement proteins and results in Alzheimer's disease-like cerebrovascular amyloidosis and microvascular degeneration (Wyss-Coray et al, 2000). Although TGF- β promotes the survival of adult neurons (Boche et al, 2003; Schober et al, 2007), it also has an apoptotic effect on proliferating neural-crest-derived multipotent progenitor cells (Hagedorn et al, 2000). Furthermore, TGF- β 1 inhibits the proliferation of adult NSCs, although both positive and negative effects of TGF- β 1 have been reported on adult neurogenesis (Battista et al, 2006; Buckwalter et al, 2006; Wachs et al, 2006).

This study explores whether the decline in SVZ neurogenesis during aging or following irradiation is merely a function of NSC depletion or reflects more profound changes in the NSC vascular niche. We demonstrate that TGF- β pathway activation was persistently increased in the SVZ niches of irradiated or aged mice. We also report that the selective inhibition of this pathway significantly improved neurogenesis.

RESULTS

High-dose radiation decreases neurogenesis but spares NSCs

A mouse model of whole-brain irradiation with a total radiation dose of 15 Gy, divided into three doses of 5 Gy that were delivered at 48 h intervals, was used to explore the effects of radiation on adult neurogenesis in the SVZ. This 15 Gy split-dose irradiation paradigm did not provoke the mobilization or the activation of microglial cells with respect to the number and the resting morphology of CD68⁺ and Iba1⁺ cells in the SVZ/striatum (Supporting Information Fig S1).

As estimated by Ki67-positivity, proliferation was dramatically decreased in the SVZ 4 months following radiation exposure, and the total number of nuclei was also reduced (Supporting Information Fig S2). Despite this reduced proliferation capacity, the survival of NSCs was indicated by the presence of Nestin⁺GFAP⁺ double-positive cells lining the lateral ventricle that were negative for S100 β (Supporting Information Fig S3).

We previously reported that this irradiation regimen reduces the number of neuroblasts in the SVZ and decreases their arrival at the OBs, inducing olfactory memory deficits in mice (Lazarini et al, 2009). The drastic decrease in neuroblasts/type A and TAPs/type C cells was also observed 1 year following irradiation (Fig 1B and C). Although their absolute number was decreased, half of the type B cells persisted for 1 year following exposure (Fig 1B and C).

We further examined the content of NSCs and their progeny at 4 months by FACS analysis on freshly dissociated microdissected SVZs. In agreement with the reduction in proliferation described above, the total number of cells in the dissociated SVZ decreased to $25 \pm 5 \times 10^3$ cells/SVZ 4 months following irradiation compared to $47 \pm 7 \times 10^3$ cells in young non-irradiated control mice ($p = 0.019$). The total number of SVZ cells also significantly decreased in 12-month-old (*i.e.* middle-aged) mice, reaching $32 \pm 4 \times 10^3$ cells/SVZ ($p = 0.032$). Given that LeX is expressed in the SVZ on GFAP-positive cells that have NSC features (Capela & Temple, 2002), an anti-LeX antibody was used in combination with CD24 and an EGF fluorescent ligand to label neuroblasts and activated NSCs. According to a previous report (Pastrana et al, 2009), we defined the following three populations: (i) CD24⁺LeX⁺EGFR⁺ activated NSCs, (ii) CD24⁺LeX⁺EGFR⁺ TAPs and (iii) CD24⁺ neuroblasts. The purity of these sorted SVZ populations was confirmed using qRT-PCR for the mRNA expression levels of specific NSC, TAP and neuroblast markers (Supporting Information Fig S4).

As was expected from our previous findings (Lazarini et al, 2009), a decrease in CD24⁺ neuroblasts was observed in irradiated mice (Fig 1D). The percentage of TAPs (EGFR⁺LeX⁺) diminished in the SVZ of both middle-aged and irradiated mice (Fig 1E), whereas the relative number of NSCs (LeX⁺EGFR⁺) was unaltered (Fig 1F). FACS analysis using GLAST, which is another NSC marker that is expressed on nearly all LeX-positive cells (Supporting Information Fig S4D), confirmed that the percentage of CD24⁺GLAST⁺ cells, *i.e.* the population that contained NSCs, was maintained in the SVZ following irradiation and during aging (Supporting Information Fig S5).

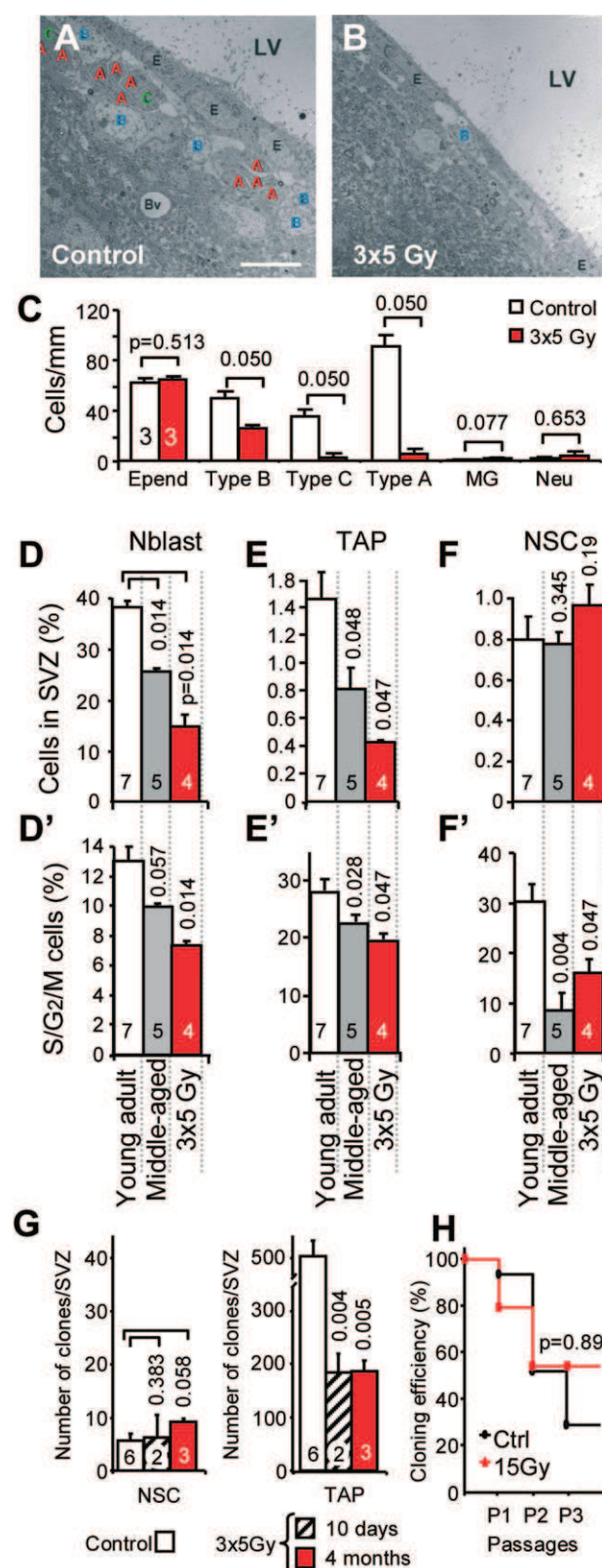


Figure 1. NSCs resisted high radiation exposure but presented proliferation defects.

A,B. Electron microscopy revealed the persistence of type B/NSCs 1 year following irradiation in the SVZ, whereas type C/TAPs and type A/neuroblasts were nearly completely lost. Scale bar: 10 μ m.

C–F. Ependymal cell (Epend), neuron (Neu) and microglial cell (MG) numbers were unaltered. FACS analysis of SVZ populations (percentage in D–F) and their proliferating fraction (DNA $>2N$ in D'–F'): neuroblasts (CD24 $^{+}$ in D and D'), TAPs (EGFR $^{+}$ in E and E') and activated NSCs (LeX $^{+}$ EGFR $^{+}$ in F and F'). The p -value was determined using the Mann–Whitney U -test.

G. The quantification of NSCs and TAPs in the N-CFCA. The mean \pm SD of two to five independent experiments is shown (the number of mice is indicated within the bars). The p -value was determined using the Mann–Whitney U -test.

H. NSC-derived clones were subcultured to confirm their self-renewal capacity. The Kaplan–Meier's analysis is shown.

However, as the total number of cells was reduced in the SVZ, the absolute number of NSCs was decreased following irradiation and during aging; however, this decrease was less pronounced than for their progeny. Moreover, all of these populations exhibited a diminution in their proliferation status (DNA content $>2N$), being reduced for NSCs by 72% and 47% during aging and following irradiation, respectively (Fig 1D'–F').

These findings led us to analyse the capacity of SVZ cells from irradiated mice to form neurospheres in the presence of EGF and FGF2 using the neural colony forming cell assay (N-CFCA), which enables NSCs to be discriminated from TAPs based on neurosphere size (Louis et al, 2008). When SVZ cells from irradiated mice were cultured in N-CFCA, small neurospheres that were initiated by TAPs were reduced in number following irradiation, an effect that was observed at both 10 days and 4 months (Fig 1G). In contrast, larger neurospheres that were derived from NSCs were generated with the same efficacy as control mice, suggesting that NSCs resisted this radiation regimen and preserved their capacity to proliferate *in vitro* (Fig 1G). These neurospheres were individually subcultured in neurosphere medium; half of these neurospheres exhibited a capacity for self-renewal for three subsequent passages, with similar efficiencies for the irradiated mice and the controls (Fig 1H).

Therefore, our data demonstrate that radiation induced a dramatic decrease in neurogenesis despite the persistence of functional NSCs, as was previously reported in aged mice (Ahlenius et al, 2009).

The NSC niche is altered following irradiation

In light of these results, we reasoned that the dramatic decline in neurogenesis may be rooted in an alteration in the NSC microenvironment rather than the intrinsic loss of the NSCs. To test this hypothesis, we used a transplantation model in which neural stem/progenitor cells were grafted into the SVZ of irradiated hosts or control C57Bl6 mice.

Antibodies to clusters of differentiation markers were used to remove endothelial cells (CD31), microglial/blood cells (CD45) as well as ependymal and neuroblasts (CD24) from young mouse SVZs. Freshly sorted CD24 $^{-}$ CD31 $^{-}$ CD45 $^{-}$ triple negative cells were enriched in neural stem/progenitor cells (58%

GFAP⁺, 51% Sox2⁺ and 26% LeX⁺) and nearly devoid of neuroblasts (<1% Dcx⁺). NSC/TAP-enriched GFP⁺ cells were unilaterally transplanted near the SVZ in adult hosts. One month following transplantation, no evidence of graft rejection, such as phagocytosis by host cells, was observed (Supporting Information Fig S6A). GFP⁺ cells in the non-irradiated hosts were composed of proliferating Ki67-positive and Dcx-positive cells (Fig 2A,C and Table 1). A third of the GFP⁺ cells expressed GFAP, whereas these cells were negative for S100 β , indicating that they were not mature astrocytes (Fig 2B,D and Table 1). Moreover, grafted GFAP⁺ cells exhibited a small number of elongated cytoplasmic processes that were similar to those of NSCs, distinguishing them from the typical stellate morphology of mature astrocytes. A subset of GFP⁺ cells were observed along the rostral migratory stream and integrated into the OBs, expressing neuronal-lineage markers, such as NeuN (Supporting Information Fig S6C). Moreover, GFP⁺ cells that had characteristics of functional neurons, with a dendritic spine that contacted the synapse of a host cell, were observed by electron microscopy (Supporting Information Fig S6D). These observations indicated that grafted GFP⁺CD24⁺CD31⁺CD45⁺ cells were neurogenic. Furthermore, it is worth noting that electron microscopic analyses of the graft demonstrated that GFP⁺ astrocyte-like cells were in close contact with blood vessels (Fig 2E), similar to what has been observed for normal endogenous type B NSCs (Tavazoie et al, 2008). Thus, these transplantation experiments recapitulated endogenous SVZ neurogenesis within vascular niches.

In sharp contrast, although NSC/TAP-enriched GFP⁺ cells survived for 1 month when grafted into the SVZ of irradiated hosts, they ceased proliferating, as was revealed by the absence of Ki-67 expression and the lack of BrdU incorporation (Fig 2F and Supporting Information Fig S6B). Nonetheless, a quarter of the GFP⁺ cells in the SVZ still expressed GFAP, whereas a third differentiated into Dcx⁺ neuroblasts (Fig 2G,H and Table 1). A subset of GFP⁺ cells integrated in the OBs and expressed neuronal markers (Supporting Information Fig S6C and D).

These transplantation data suggest that modifications of the vascular SVZ niche following irradiation are involved in the inhibition of NSC proliferation and the subsequent decrease in neurogenesis.

Neither irradiation nor aging increase the mural coverage of SVZ microvessels

One may speculate that irradiation-induced increases in the mural coverage of SVZ microvessels would disturb the intimate interactions of NSCs with endothelial cells and thereby impact neurogenesis. SVZ capillaries that were just beneath and tangential to the ependymal layer were analysed by immunostainings for laminin and desmin which are a major component of the basement membrane and an intermediate filament expressed on pericytes, respectively. In non-irradiated controls, the capillaries presented staining for laminin and partially covered with desmin (Fig 3A). Consistently, electron microscopy revealed that only 30% of the SVZ capillary surface were covered by pericytes (Fig 3B), which is in agreement with the partial coverage of SVZ microvessels (Tavazoie et al,

2008). NG2/desmin immunostainings revealed 1.5 pericytes per 100 μ m of length of SVZ capillaries in the control mice (Fig 3C and D). Despite a slight increase in microvessels coverage (Fig 3B), irradiated mice did not present any significant effects on pericytes (Fig 3A–C).

The effects of aging on SVZ capillaries were somewhat different, as desmin immunostaining was diminished (Fig 3A) and a decrease was observed in the number of NG2/pericytes (Fig 3C).

Therefore, our data exclude the possibility that an increase in the mural coverage of SVZ blood vessels was involved in the decrease in neurogenesis following irradiation or during aging.

TGF- β 1 and Smad3 signalling increase in the vascular niche during aging and following irradiation

We hypothesized that factor(s) from SVZ endothelial cells may directly perturb NSCs. TGF- β 1 is the prototypical anti-mitotic cytokine and that the cytostatic effects of TGF- β are critical for homeostasis in many epithelial tissues (Massague, 2012). Furthermore, this factor is upregulated in the brain after different forms of injuries (Gomes et al, 2005) and during aging (Werry et al, 2010).

We observed TGF- β 1 immunostaining that was associated with microvessels in the SVZ from irradiated and middle-aged animals (Fig 4B and C), an effect that was remarkably stronger in elderly mice (Fig 4D). In contrast, staining was nearly undetectable in young adult mice (Fig 4A). To confirm that TGF- β 1 was indeed upregulated in irradiated BECs, the cells were sorted by FACS using an anti-CD31 antibody from whole brains 4 months following irradiation. Blood cells were excluded using an anti-CD45 antibody. Quantitative RT-PCR analysis indicated that the expression level of TGF- β 1 was increased by twofold in irradiated BECs (Fig 4E). We therefore conclude that TGF- β 1 production increased in vascular niche BECs following irradiation and during aging.

Two TGF- β receptor chains, T β RI and T β RII, are required for TGF- β 1 binding and signalling through Smad2/3 phosphorylation and for the latter's subsequent translocation into the nucleus (Massague, 2012). T β RII expression has been observed on nestin-positive adult neural progenitors (Wachs et al, 2006). We analysed the expression of T β RI and T β RII using immunofluorescence on freshly dissociated SVZ cells from control young adult mice. The expression of both receptors was associated with NSCs and TAPs (GFAP⁺LeX⁺ and Mash1⁺), whereas both receptors were scarcely expressed in Dcx⁺ neuroblasts (Fig 4F–I).

We further examined the binding of biotinylated TGF- β 1 on SVZ cells from young mice and observed that it bound to nearly 50% of activated NSCs but to only 17% of TAPs and 3% of neuroblasts (Fig 4J and Supporting Information Table 1). This result confirmed the preferential expression of TGF- β receptors on NSCs. A significant increase in TGF- β 1 binding was observed on cycling SVZ cells (DNA content >2N) during aging and following irradiation (Fig 4J).

Smad2 phosphorylation was undetected in the SVZ, even following irradiation or during aging (Supporting Information Fig S7). However, strong Smad3 phosphorylation was observed

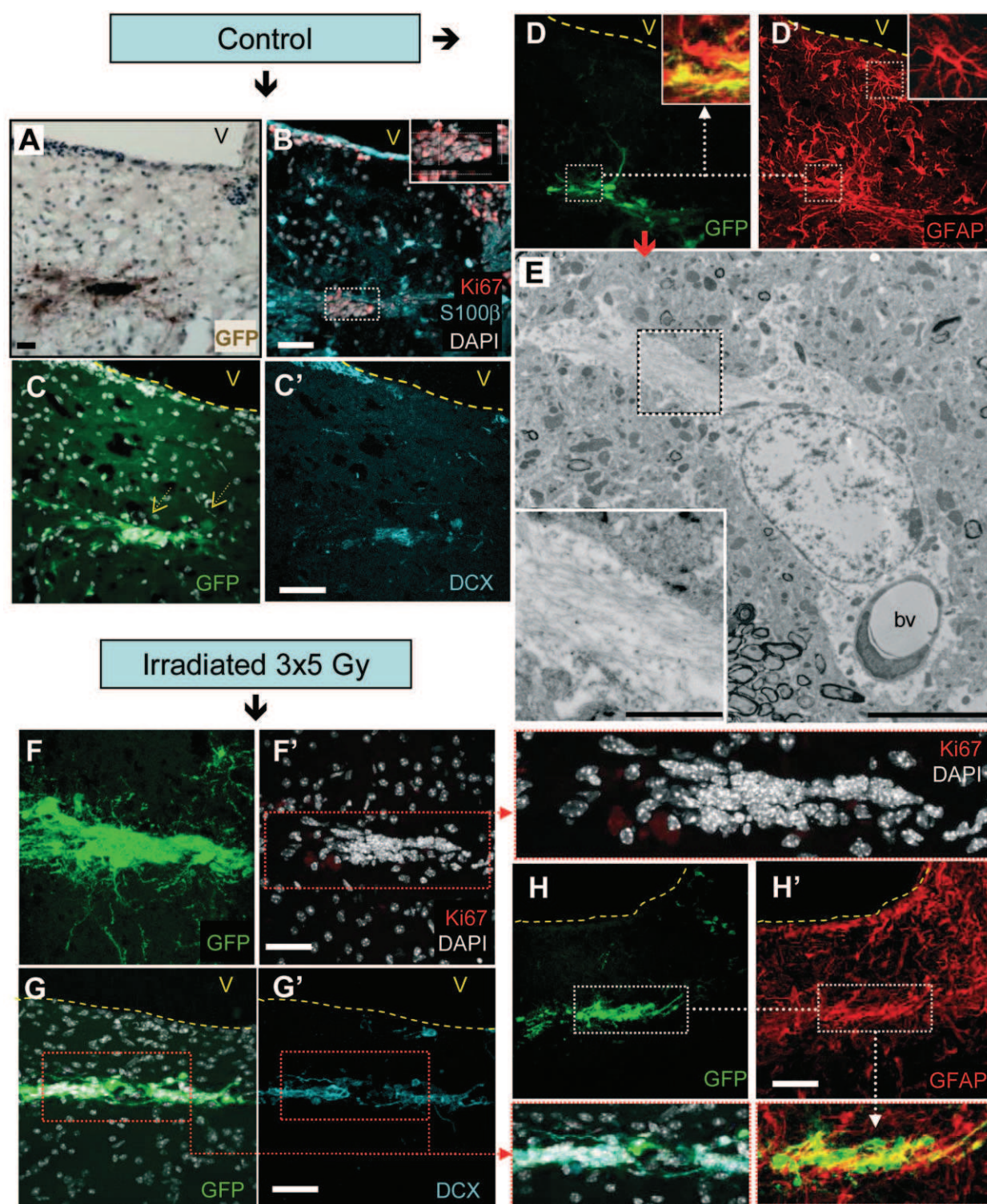


Figure 2. NSCs ceased to proliferate when grafted into irradiated SVZ niche.

A–H. NSC/TAP-enriched SVZ cells from GFP mice were transplanted near to the SVZ in both control (A–E, $n = 4$) and irradiated mice (F–H', $n = 5$). One month after grafting in non-irradiated hosts, the GFP grafts were composed of proliferating Ki67-positive cells (B, inset), Dcx⁺ neuroblasts (C and C') and GFAP⁺ astrocyte-like cells (D and D'). GFP⁺ cells with an astrocyte-like phenotype had contact with blood vessels (E). The inset shows the GFP-immunogold labelling and the abundant filamentous components that are typical of astrocytes. When grafted into irradiated hosts, NSC/TAP-enriched GFP cells discontinue proliferation (F and F') but still contain Dcx⁺ neuroblasts (G and G') and GFAP⁺ cells (H and H'). Scale bars for light microscopy: 50 μ m; for electron microscopy: 10 μ m and inset 1 μ m.

Table 1. Phenotype of grafted GFP cells after transplantation within SVZ

Mice (n)	GFP cells			
	Cells/graft	Ki67 (%)	GFAP (%)	Dcx (%)
Ctrl (4)	5959 ± 3090	32 ± 26	38 ± 23	50 ± 26
3 × 5 Gy (5)	4374 ± 1301	0 ± 0	26 ± 13	28 ± 5
	<i>p</i> = 0.274	<i>p</i> = 0.008	<i>p</i> = 0.200	<i>p</i> = 0.170

The *p*-value was calculated by Mann–Whitney *U*-test.

in the nucleus of the majority of SVZ cells from irradiated mice as well as in most SVZ cells from aged mice. In contrast, Smad3 staining was barely detectable in SVZ cells from young adult mice (Fig 4K–N). Interestingly, GFAP⁺ cells that were localized beneath the ependymal layer exhibited Smad3 phosphorylation, suggesting that the activation of TGF-β signalling occurred in NSCs following irradiation and aging (Fig 4L–N).

In conclusion, TGF-β production increased in vascular niches, particularly by BECs, during aging and following irradiation. This increased production in turn activated TGF-β/Smad3 signalling in NSCs and TAPs.

Irradiated BECs provoke neural stem/progenitor apoptosis through TGF-β

We analysed *in vitro* how TGF-β1 signalling affected the fate of neural stem/progenitor cells. Long-term neurosphere growth was clearly reduced upon the addition of 10 ng/ml of TGF-β1 in culture (Fig 5A). The transient addition of TGF-β1 during the first week reduced proliferation in a reversible manner; however, its continuous addition completely ceased growth at the fourth passage (Fig 5A). The size of neurospheres was significantly reduced (Fig 5B); however, the number of initiated neurospheres was unaltered, as previously reported (Wachs et al, 2006). This effect of TGF-β1 was dose-dependent, being maximal at 1 ng/ml, and was prevented by the addition of an anti-TGF-β blocking antibody (Fig 5B and Supporting Information Fig S8).

As expected, the addition of TGF-β1 to the culture induced the rapid phosphorylation of Smad3 in neurosphere cultures from young adult mice, and this phosphorylation was specifically blocked by the anti-TGF-β blocking antibody or SB-505124, which is a selective inhibitor of TβRI (Alk5) (Fig 5C). We also observed a rapid increase in the expression of both p21^{Waf} and cyclin D1 in nearly all of the neurosphere cells (Fig 5E–F), a result that is consistent with the anti-proliferative effect of TGF-β1 on foetal neural progenitors (Seoane et al, 2004).

Subsequently, we analysed whether the inhibition of neurosphere growth in the presence of TGF-β1 was linked to the death of neural progenitors. The number of dying cells (permeable to propidium iodide) dramatically increased in the presence of TGF-β1 in neurosphere cultures for several passages (Fig 5D). Moreover, the addition of TGF-β1 also induced the expression of cleaved caspase 3 in neurospheres, and this expression was associated with pyknotic nuclei (Fig 5G and H). These data indicated that exposure to TGF-β1 promoted apoptosis in proliferating neural stem/progenitor cells.

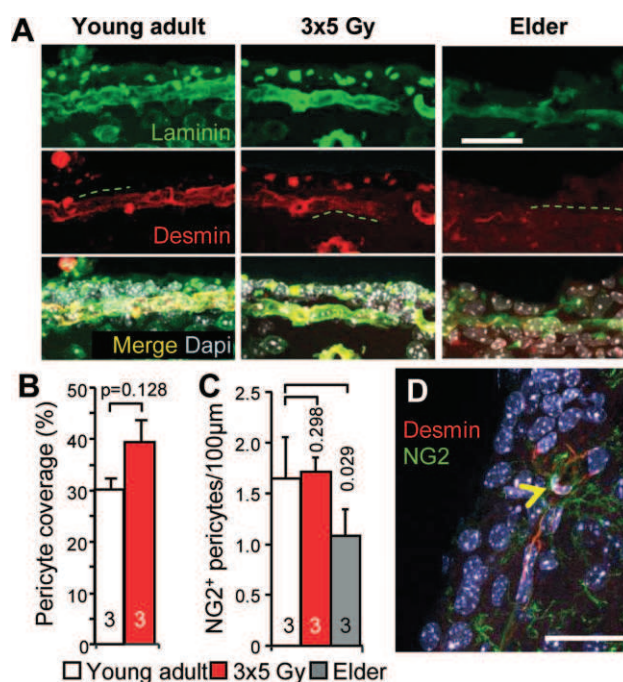


Figure 3. Pericyte coverage of SVZ capillaries is not increased following irradiation and during aging. Scale bars = 50 µm. The *p*-value was determined using the Mann–Whitney *U*-test (B) and the Kruskal–Wallis test (C).

- SVZ capillaries presented laminin immunostaining but had partial desmin mural coverage, with this marker being absent from regions with numerous nuclei (dashed line).
- The pericyte coverage of SVZ microvessels was examined using electron microscopy.
- The quantification of NG2/pericytes on SVZ capillaries following irradiation and during aging. The mean ± SD is shown and the number of mice is indicated within the bars.
- A NG2/pericyte on a SVZ capillary is shown (arrowhead).

Consistently with our *in vivo* data, 5 Gy radiation increased the levels of TGF-β1 in a BEC line (Fig 6A). We therefore performed co-culture experiments with irradiated BECs and neurosphere cells to model interactions within vascular SVZ niches. Neural progenitors that were obtained in neurosphere cultures were plated on laminin to allow for immunostaining of the isolated cells. Next, irradiated or non-irradiated BECs were added on top of the well that contained adherent neural progenitors. Sox2 and Mash1 were expressed in nearly all of the adherent cells in the co-culture, regardless of whether the BECs were irradiated (Fig 6C and Supporting Information Fig S9). This result confirms that they were indeed neural stem/progenitors, *i.e.* activated NSCs and TAPs. As anticipated, the phosphorylation of Smad3 increased in neural stem/progenitors in the presence of irradiated BECs compared to the control BECs in a TGF-β-dependent manner, as the addition of the anti-TGF-β blocking antibody abolished this increase (Fig 6B). The analyses of pyknotic nuclei and activated caspase 3 positivity revealed

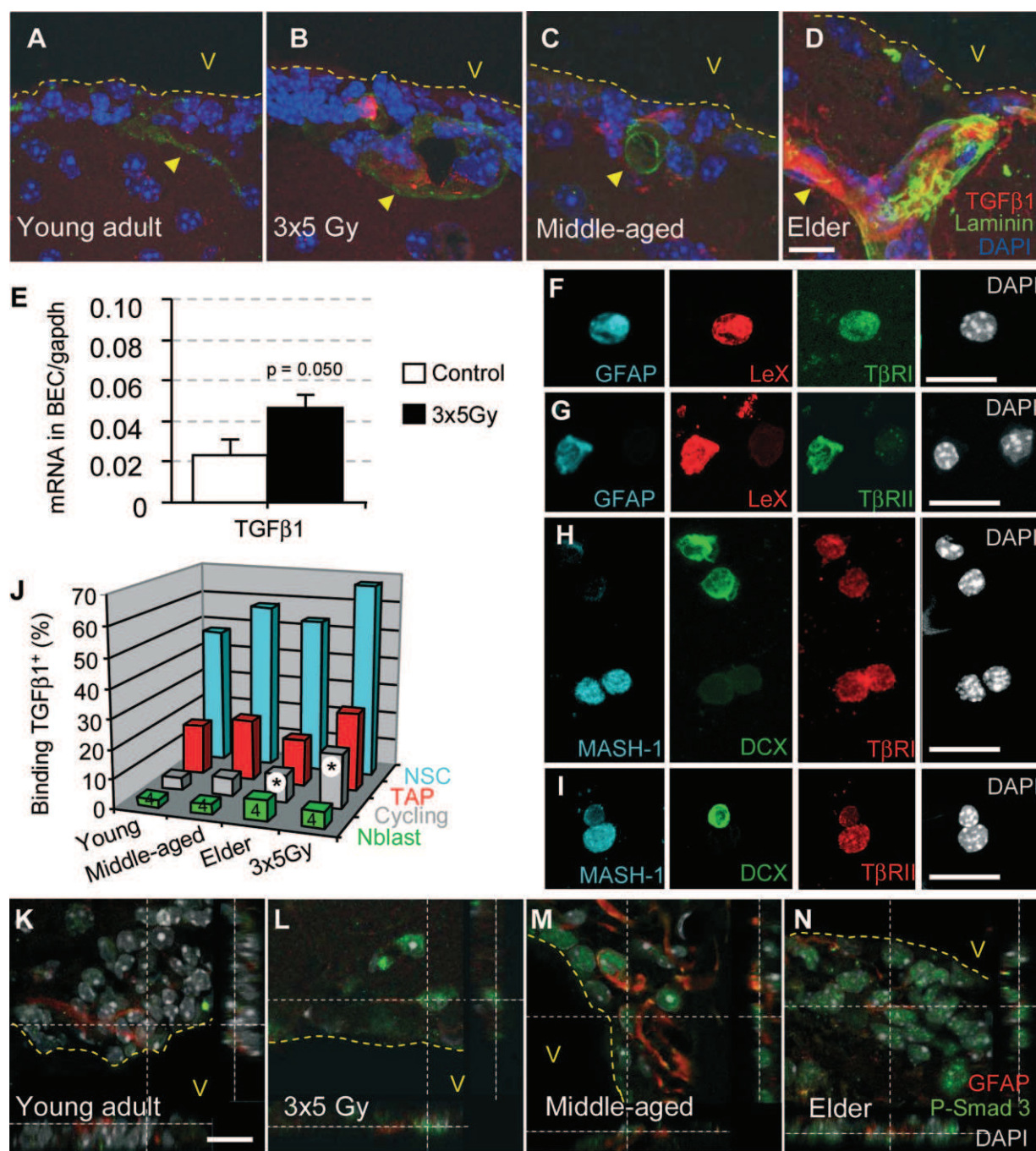


Figure 4. TGF- β /Smad3 signalling increases in the stem cell niche during aging and following irradiation. The data are represented as the mean \pm SD. The p -value was determined using the Mann-Whitney U -test ($^*p = 0.020$; all of the other p values are given in Supporting Information Table 2). The illustrations are representative of three different experiments, with three mice per group. Scale bars = 10 μ m.

A–D. Increasing levels of TGF- β 1 were observed in close contact with SVZ microvessels (laminin-positive) during aging and following irradiation.

E. TGF- β 1 mRNA expression by qPCR in sorted BECs.

F–I. T β RI and T β RII are abundant on freshly dissociated GFAP $^{+}$ LeX $^{+}$ and Mash1 $^{+}$ cells.

J. The binding of biotinylated TGF- β 1 to neuroblasts (CD24 $^{+}$), NSCs (GLAST $^{+}$ CD24 $^{-}$) and proliferating cells (DNA $>2N$).

K–N. The phosphorylation of Smad3 was observed in the majority of SVZ cells in irradiated and aged mice, including cells with a GFAP $^{+}$ type B/NSC phenotype.

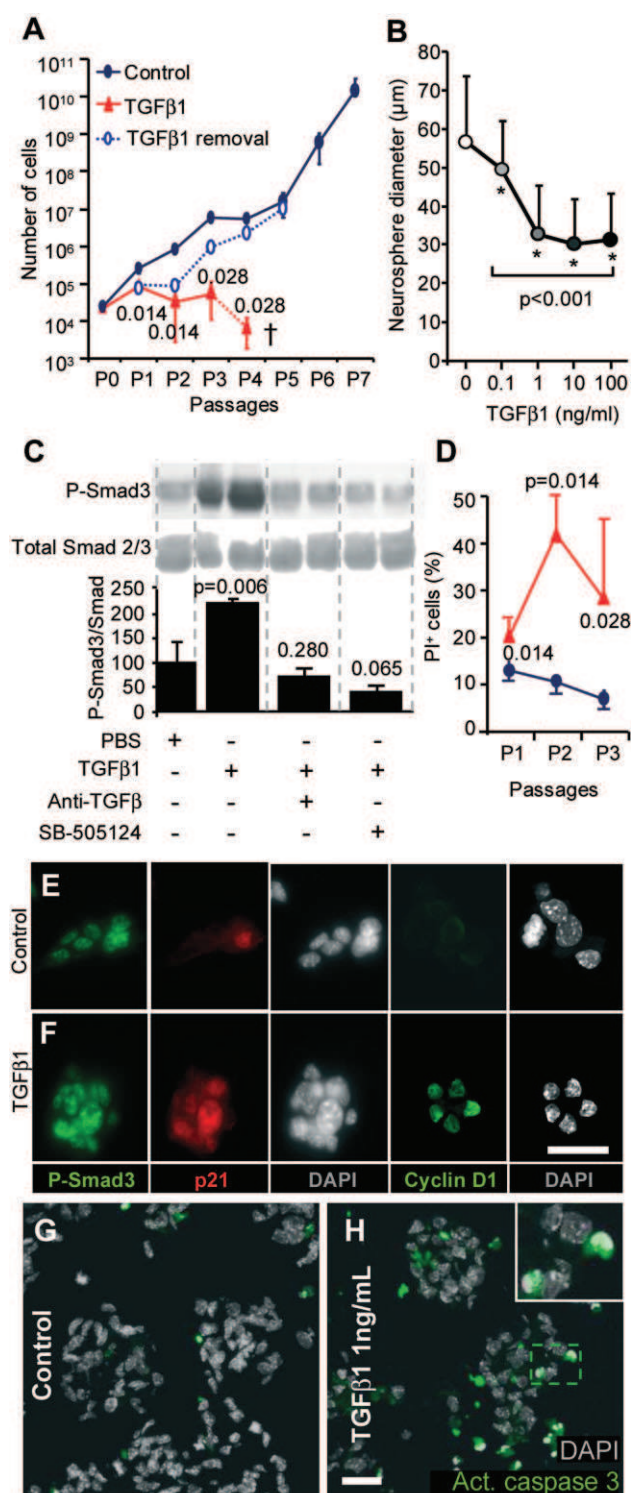


Figure 5. TGF- β signalling delays neurosphere growth and induces the apoptosis of neural stem/progenitor cells. The mean \pm SD is shown. The p -value was determined using the Mann–Whitney U -test (A, C and D) and Student's t -test (B). Scale bars = 10 μ m.

- A.** Absolute number of cells in neurosphere cultures in the presence of TGF- β 1 (10 ng/ml) at each passage (cultures stopped at the fourth passage) or in which TGF- β 1 was removed after the first passage.
- B.** Neurosphere size 7 days following the addition of different concentrations of TGF- β 1.
- C.** The phosphorylation of Smad3 following the addition of TGF- β 1, and the reversal of this effect by blocking with an anti-TGF- β antibody or SB-505124. The histogram represents the quantifications of the western blots, with normalization to total Smad2/3. Source data is available for this figure in the [Supporting Information](#).
- D.** Dying cells (permeable for propidium iodide) were quantified by FACS.
- E,F.** P-Smad3, p21^{waf} and cyclin D1 were induced in neurospheres following TGF- β 1 addition.
- G,H.** Cleaved caspase 3 staining and pyknotic nuclei revealed apoptotic cells in neurospheres that were treated for 24 h with TGF- β 1.

progenitor was completely reversed with the addition of the anti-TGF- β neutralizing antibody (Fig 6C–E).

Our data indicate that the release of TGF- β by irradiated BECs promoted the apoptosis of NSCs and TAPs.

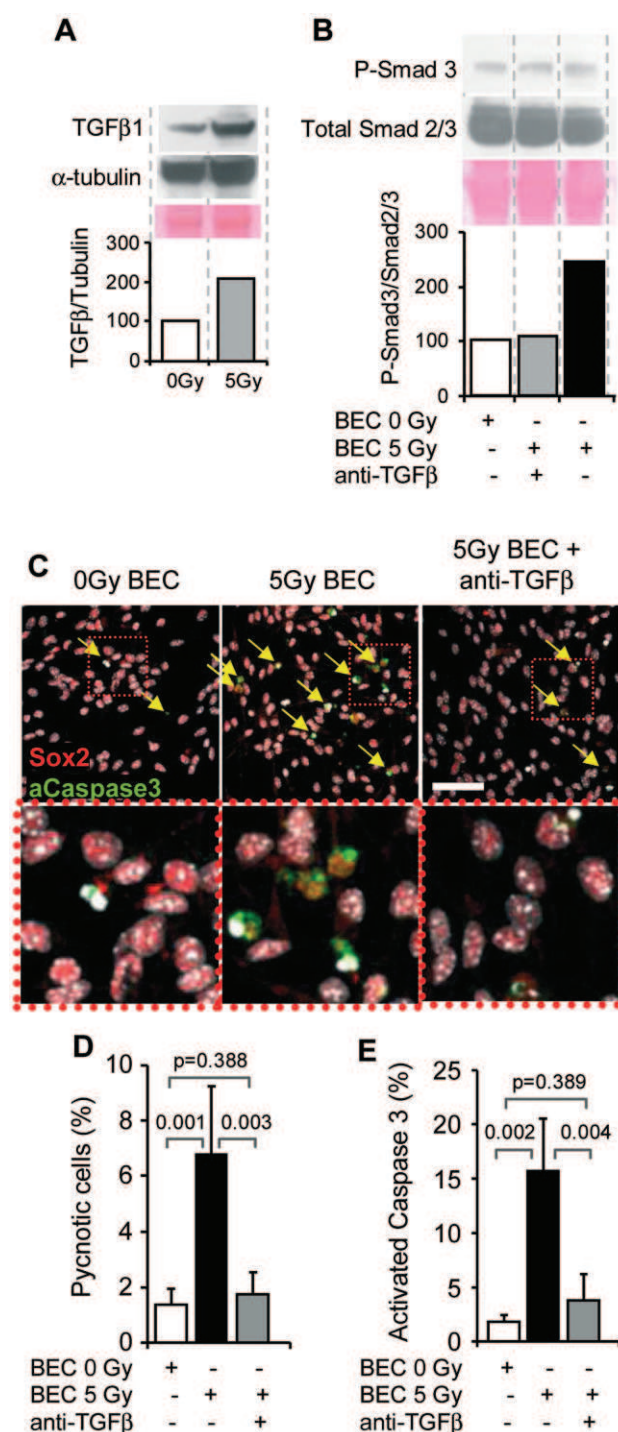
The pharmacological blockade of TGF- β signalling restores neurogenesis *in vivo*

If TGF- β 1 levels increase during aging or following irradiation, it appears logical to hypothesize that the blockade of TGF- β signalling in irradiated mice would enhance neurogenesis *in vivo*. Two different approaches were used to block TGF- β signalling *in vivo*. First, the intravenous administration of anti-TGF- β antibody was utilized given that the increase in TGF- β 1 was associated with blood vessels. Second, SB-505124 was administered intranasally. Intranasal delivery is an efficient route for the transport of drugs into the central nervous system (Prediger et al, 2010); moreover, this type of delivery eliminates the undesired side effects that are characteristic of systemic delivery. The treatments were administered three times over 5 days in irradiated or elderly mice.

The effects of blockade of TGF- β signalling were first examined on SVZ capillaries, as this cytokine is known to exert different effects on vascular development, including the induction of pericyte differentiation and adhesion, as well as the production of extracellular matrix or basement membrane (Winkler et al, 2011). Both the anti-TGF- β antibody and SB-505124 dramatically reduced the levels of laminin and decreased desmin coverage in irradiated and aged mice (Supporting Information Fig S10A). However, the treatments did not alter the number of NG2/pericytes (Supporting Information Fig S10B).

Next, BrdU incorporation was used to examine the effects of anti-TGF- β therapy on neurogenesis. This analysis was performed to estimate cell proliferation during the treatment as well as to trace newly generated cells (Fig 7A). To obtain quantitative data for the entire SVZ, BrdU incorporation was first examined by FACS. As expected from the decrease in neurogenesis, BrdU incorporation was noticeably lower in SVZ

that a small number of apoptotic cells were observed in co-culture for 24 h with non-irradiated control BECs; however, the level of apoptotic neural stem/progenitors (*i.e.* Sox2⁺) significantly increased in the presence of irradiated BECs (Fig 6C–E). Remarkably, irradiation-induced apoptosis of neural



cells from irradiated mice as well as in SVZ of elderly mice compared to young adult mice (Fig 7B, $p = 0.025$ and $p = 0.050$, respectively). The blockade of TGF- β signalling in irradiated and aged mice, using the anti-TGF- β neutralizing antibody and SB-505124 increased the number of proliferating cells in the SVZ (Fig 7B). This increase in the number of BrdU $^{+}$ cells in the SVZ of irradiated and aged mice receiving anti-TGF- β therapy was further confirmed by microscopic analyses (Fig 7C). By contrast,

Figure 6. Irradiated BECs provoke neural progenitor apoptosis through TGF- β . Source data is available for this figure in the [Supporting Information \(A,B\)](#).

A. The protein levels of TGF- β 1 in BEC line (bEnd3) 24 h after 5 Gy irradiation.

B–E. Irradiated or control neurosphere cells were co-cultured for 24 h in the presence of the BEC cell line with an anti-TGF- β antibody. (B) The level of P-Smad3 in neurosphere cells by western blot. (C–E) The apoptosis of neural stem/progenitor cells was quantified using cleaved caspase three staining and the counting of pyknotic nuclei. The mean \pm SD from two independent experiments are represented in (D–E). The p -value was determined using the Kruskal–Wallis test. Scale bar = 50 μ m.

the treatment of young adult mice with SB-505124 did not alter the number of BrdU $^{+}$ cells (Fig 7B), suggesting that the efficacy of anti-TGF- β signalling was only related to the elevated TGF- β levels that were observed in the pathophysiological conditions of aging and radiation exposure.

The amelioration of the decline in neurogenesis was also demonstrated by an increase in neuroblast production in the SVZ in both irradiated and aged mice receiving anti-TGF- β therapy (Supporting Information Fig S11A). We then traced the fate of new neuroblasts 3 weeks after BrdU incorporation, which is sufficient time for them to reach the OBs. Dcx immunostaining in the OBs increased in irradiated mice 3 weeks following treatment with the anti-TGF- β antibody in comparison to irradiated mice (Fig 7G), confirming the efficacy of anti-TGF- β therapy for improving neurogenesis. Moreover, numerous Dcx $^{+}$ cells in the OBs were also BrdU-positive (Fig 7H and I), strongly suggesting that they originated from NSCs that had proliferated at the time of anti-TGF- β therapy. Interestingly, Dcx immunostaining remained elevated in the SVZ 3 weeks following treatment (Fig 7J and K), indicating that anti-TGF- β therapy had long-lasting effect on neurogenesis and most likely targeted immature neural stem/progenitor cells. Remarkably, numerous GFAP $^{+}$ cells lining the lateral ventricle retained BrdU labelling long-term following the administration of SB-505124 in irradiated mice (Fig 7M), indicating that anti-TGF- β treatment increased the number of NSCs with long cell cycle (Morshead et al, 1998). We then quantified BrdU incorporation by FACS in candidate NSCs with the CD24 $^{-}$ GLAST $^{+}$ phenotype. The level of CD24 $^{-}$ GLAST $^{+}$ cells was unaltered in irradiated and aged mice compared to young adults (Fig 7D); however, their proliferation rate (BrdU incorporation) was diminished (Fig 7E), confirming the data that are shown in Fig 1F'. The administration of SB-505124 slightly increased the percentage of CD24 $^{-}$ GLAST $^{+}$ cells in the SVZ, an effect that reached statistical significance for aged mice (Fig 7D). Furthermore, the treatment of irradiated or aged mice with SB-505124 significantly increased the BrdU incorporation within CD24 $^{-}$ GLAST $^{+}$ cells, indicating that this treatment provoked cell cycle entry of NSCs; however, this treatment had no effect in young adult mice (Fig 7E). These results were further confirmed by FACS analyses on CD24 $^{-}$ LeX $^{+}$ NSCs (Supporting Information Fig S11).

We also examined the effect of anti-TGF- β therapy on apoptosis by estimating the number of pyknotic nuclei for the

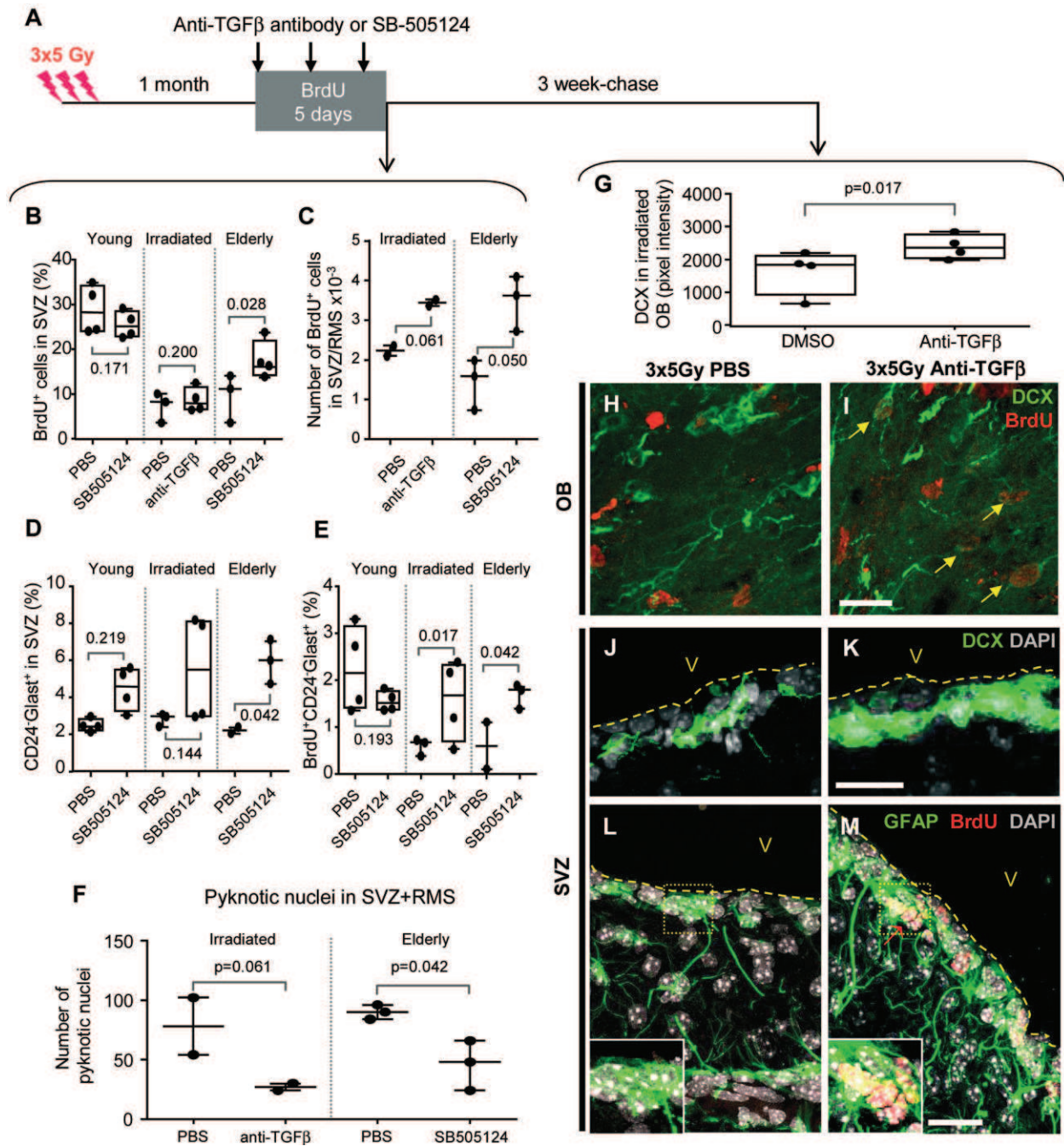


Figure 7. Pharmacological blockade of TGF- β signalling restores neurogenesis *in vivo*. The mean value for each mouse is plotted individually, and the error bars represent the standard deviation that was obtained from two independent experiments. The *p*-value for comparison between treated and control groups was determined using the Mann–Whitney *U*-test (F–G).

- A.** Experimental schedule for the treatment by intravenous injection of anti-TGF- β -neutralizing antibody or the intranasal administration of SB-505124. The mice were euthanized 1 day after the final treatment (left panel) or after a 3-week chase (right panel).
- B,C.** The quantification of BrdU incorporation in SVZ cells by FACS (B) and by immunostaining (C).
- D,E.** FACS analysis of NSCs (D) and BrdU incorporation in NSCs (E) following SB-505124 treatment in old or irradiated mice.
- F.** The quantification of pyknotic nuclei in serial coronal SVZ sections.
- G–M.** The irradiated mice were treated with an anti-TGF- β antibody (H, J, L) or untreated (I, K, M). In the OBs, anti-TGF- β antibody treatment increased the Dcx fluorescence intensity (G) and the number of BrdU/Dcx-double-positive neuroblasts (arrows in I). In the SVZ, anti-TGF- β antibody treatment increased Dcx staining (K) and the presence of candidate NSCs GFAP⁺ with long-term BrdU label retaining (M, red arrow). Scale bar = 50 μ m.

entire SVZ and RMS. The administration of the anti-TGF- β antibody to irradiated mice reduced the number of apoptotic cells; similar results were observed in aged mice following treatment with SB-505124 (Fig 7F).

Together, these experiments demonstrated that the selective blockade of TGF- β signalling improved neurogenesis in aged and irradiated mice by preventing the apoptosis of neural progenitors and by inducing the proliferation of NSCs.

DISCUSSION

Our study concludes that, although neurogenesis decreased during aging and following high-dose radiation, many NSCs resisted high radiation doses and survived for several months while retaining their stemness characteristics. Our data indicate that the NSC niche becomes functionally impaired following radiation exposure and during aging. Both of these causes increase TGF- β 1 levels in BECs, causing the quiescence and apoptosis of NSCs via a TGF- β /Smad3 dependent pathway. Interestingly, the inhibition of TGF- β signalling allows for neurogenesis to efficiently recover following irradiation, suggesting that it may have far-reaching implications for aged individuals and for patients with cancer who are treated with cranial radiotherapy.

The perturbation of the vascular niche during aging and following irradiation

The vasculature is a key component of the adult SVZ NSC niche with respect to the proliferation of NSCs and TAPs under physiological conditions (Tavazoie et al, 2008). Our results illustrate that the alteration of neurogenesis that occurs following irradiation is primarily due to modifications of the vascular niche. Indeed, grafted astrocytic-like NSCs extend contacts toward brain microvascular BECs, similar to endogenous NSCs (Tavazoie et al, 2008); however, these cells stop proliferating when transplanted into irradiated hosts. We further demonstrated that an increase in the mural coverage of SVZ blood vessels was not involved in the neurogenesis decline following irradiation or during aging.

The mobilization and activation of microglial cells into the hippocampus have been implicated in the inhibition of neurogenesis following the administration of a single 10 Gy irradiation, and the blockade of inflammation restores neurogenesis (Monje et al, 2003). In contrast, in the present study, we did not detect any excess of microglial cells in the SVZ following irradiation. The discrepancy between our study and that of Monje et al (2003) may be attributable to the irradiation protocol, given that a split dose of 15 Gy may induce less disruption to the blood brain barrier than a single 10 Gy dose (Trnovec et al, 1990).

We also demonstrate that BECs synthesize more TGF- β 1 as they are irradiated and that the increase in the TGF- β 1 levels within vascular niches is an early molecular sign of aging in middle-aged mice. Other mechanisms, such as the activation of the latent TGF- β complex with integrins or the release of circulating TGF- β 1 owing to blood–brain barrier breakdown,

may contribute to increase in the TGF- β 1 levels within vascular neurogenic niches following radiation exposure or during aging. Our data are interesting with regards to the increase in TGF- β 1 that is reported in the human brain during aging (Werry et al, 2010).

The augmentation of TGF- β 1 in the SVZ vascular niche during aging and following irradiation is associated with the activation of the canonical TGF- β signalling pathway in SVZ cells, including NSCs. Thus, TGF- β 1 overproduction by BECs following irradiation and during aging may participate in the deregulation of neurogenesis.

Mechanism of neurogenesis perturbation by TGF- β 1

Here, we unambiguously demonstrate that NSCs and TAPs are primary targets for TGF- β 1, and an increase in TGF- β 1 levels during aging and following irradiation leads to the inhibition of neurogenesis. We demonstrate that T β R chains are present on both NSCs and TAPs. Furthermore, we demonstrate that TGF- β 1 binding increases with aging and following irradiation. From a mechanistic perspective, we demonstrate that the activation of the canonical TGF- β signalling pathway via the phosphorylation of Smad3, but not of Smad2, occurs in NSCs and TAPs *in vivo* and *in vitro*. Although we demonstrated that TGF- β /Smad3 signalling is activated in neural stem/progenitors, a genetic approach, such as T β R inactivation in neural stem/progenitors, would be necessary to exclude the possibility that TGF- β plays an indirect role, *e.g.* through the microenvironment. Whereas Smad3 triggers TGF- β , activin and Nodal signalling, our data suggest that Smad3 is activated in response to TGF- β given that its phosphorylation is specifically blocked with the anti-TGF- β antibody.

Previous studies reported the negative effects of TGF- β 1 on adult neurogenesis and neural progenitor proliferation in both the hippocampus and the SVZ (Buckwalter et al, 2006; Wachs et al, 2006). It has also been observed to have apoptotic effects on proliferating neural-crest-derived multipotent progenitor cells (Hagedorn et al, 2000). Our data demonstrate that TGF- β 1 induces apoptosis of proliferating Mash1⁺/Sox2⁺ neural stem/progenitors.

The increased expression of cyclin D1 stimulated by TGF- β 1 may participate in initiating apoptosis in neural stem/progenitors, as has been reported for other cell types (Han et al, 1996). Notably, we also demonstrate that co-culturing with irradiated BECs induces the apoptosis of neural stem/progenitors in a TGF- β -dependent manner, underscoring the importance of BECs in the radiation-induced decline of neurogenesis. Remarkably, anti-TGF- β therapy, using either a blocking antibody or a selective T β R inhibitor, efficiently reduces apoptosis and enables neurogenesis to recover in aged and irradiated mice. Therefore, the apoptosis of proliferating cells in the SVZ following irradiation and during aging is a characteristic of the action of TGF- β 1 on proliferating NSCs and TAPs. We cannot make conclusions regarding possible differences in sensitivity to TGF- β between activated NSCs and TAPs; however, the persistence of quiescent NSCs in irradiated or aged mice indicate that TGF- β has no or limited effects on the viability of these cells.

A transition of activated NSCs to a quiescent state rather than a loss of NSCs occurs during aging in the hippocampus is involved in neurogenesis decline (Lugert et al, 2010). Our data also support the conclusion that NSCs entered dormancy in the SVZ, an effect that is due to elevated TGF- β signalling in the vascular niche. Indeed, *ex vivo* FACS analyses clearly indicate that NSCs are more quiescent following irradiation or during aging. Treatment with anti-TGF- β therapy using either a blocking antibody or a T β R inhibitor induces proliferation in the SVZ of aged and irradiated mice. Strikingly, treatment with anti-TGF- β therapy promotes NSCs to enter the cell cycle (as shown by increases in CD24⁺GLAST⁺BrdU⁺ and CD24⁺LeX⁺BrdU⁺ cell numbers) in irradiated and aged mice. The fact that anti-TGF- β therapy has long-lasting effects on neuroblast production in the SVZ confirms that it primarily targets immature cells, *i.e.* NSCs. However, blocking TGF- β signalling in young adult mice, *i.e.* prior to the point at which an increase in TGF- β signalling is observed, does not alter the number of BrdU⁺ cells or cell cycle entry of NSCs, suggesting that the decrease in neurogenesis by TGF- β 1 is only related to the pathophysiological conditions of aging and radiation exposure.

We therefore report on a novel mechanism of neurogenesis decline following irradiation and during aging, one that perturbs the vascular niche via the upregulation of TGF- β , resulting in NSC quiescence and the apoptosis of proliferating neural stem/progenitor cells.

The blockade of TGF- β signalling in radiotherapy and aging

The split dose of 15 Gy delivered over three sessions is clinically relevant to prophylactic cranial radiation for brain metastasis, and it is well below the threshold for the vascular damage and white matter necrosis that have been observed long-term in the mouse brain following radiation exposure (Calvo et al, 1988). However, this irradiation regimen induces olfactory memory deficits in mice (Lazarini et al, 2009). The long-term effects of irradiation on normal tissues are a major limitation in increasing the dose for the eradication of cancer cells. That is, preventing or reducing the long-term side effects of irradiation has increasingly become a priority in the improvement of both tumour treatments and outcomes for patients with cancer. An increase in TGF- β 1 levels is involved in the well-documented long-term side effects of radiotherapy, *e.g.* fibrosis of the kidney, skin, lungs and intestine. Autocrine TGF- β signalling maintains the tumorigenicity of glioma-initiating cells (Seoane, 2009). The development of TGF- β signalling inhibitors has thus become an object of study in cancer therapy fields (Yingling et al, 2004).

Future research should determine whether the new neurons that are produced in the presence of anti-TGF- β therapy are functional and if our results can be extended to the hippocampus, where NSCs niche near to the vasculature.

Based on these findings, it appears a worthwhile goal to evaluate the efficacy of anti-TGF- β therapy to treat radiotherapy-induced ionising radiation injury or to rejuvenate neurogenesis in aged individuals who exhibit cognitive decline.

MATERIALS AND METHODS

Animals and irradiation procedure

C57Bl/6 and actin-GFP (Okabe et al, 1997) mouse strains were used in the present study. Mice of different ages were used: young adult (3–6 months), middle-aged (10–14 months) and elderly (15–24 months). The animals were maintained with access to food and water *ad libitum* in a colony room that was maintained at a constant temperature (19–22°C) and humidity (40–50%) on a 12:12 h light/dark cycle.

The heads of 2-month-old male C57Bl/6J mice were exposed to a ⁶⁰Co source with a medical irradiator (Alcyon) while under ketamine- (75 mg/kg; Imalgen, Merial, France) and medetomidine-induced anaesthesia (1 mg/kg; Domitor, Pfizer, France). One lead shield protected the body of the mouse during exposure. A total dose of 15 Gy was given at a dose rate of 1 Gy/min in three equal fractions that were separated by 48 h intervals (Lazarini et al, 2009). After exposure, the mice were woken up via an *i.p.* injection of atipamezole (1 mg/kg; Antisedan, Pfizer, France).

The animal experiments were performed in compliance with the European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC) and were approved by our institutional committee on animal welfare (CETEA-CEA DSV IdF).

Drug administration

During the 5 days of drug administration, the mice received BrdU (Sigma) in their drinking water at a concentration of 1 mg/L. The mice were treated three times on Days 1, 3 and 4 with a neutralizing antibody that recognizes all TGF- β -1, -2, -3 forms (mAb1835; R&D) or a selective T β R1 inhibitor, SB-505124 (Sigma). Fifty microgrammes of anti-TGF- β neutralizing antibody that was diluted in 50 μ l of NaCl 0.9% were administered intravenously under ketamine/medetomidine-induced anaesthesia. Ten microlitres of SB-505124 (360 μ M diluted in saline) were administered per nostril using a cannula with an inner diameter of 0.2 mm that was adapted to a 10 μ l Hamilton syringe and a nano-injector (KD Scientific, Holliston, MA) at a dose-rate of 12 μ l/min, as previously described (Prediger et al, 2010).

Flow cytometry analyses and cell sorting

The SVZ microdissection, papain dissociation and staining with the vital DNA dye Hoechst 33342 (1 μ g/ml for 1 h 30 min) were performed following previously described methods (Mouthon et al, 2006). For BEC isolation, C57Bl/6 brains were dissociated in collagen, as previously reported (Mathieu et al, 2008). The SVZ cells were incubated for 15 min in PBS 0.15% BSA at 4°C with the following fluorescent-coupled antibodies: CD24-PE, LeX/CD15-FITC, CD31-PE, CD45-PC5/PE and GLAST-APC, or with EGF-Alexa647 (1:200; Invitrogen).

For the TGF- β -binding experiments, freshly dissociated SVZ cells were labelled using human TGF- β 1 biotinylated/avidin-FITC Fluorokine Kit (R&D). For the BrdU staining, the cells were fixed with Cytofix/Cytoperm and processed using a BrdU Flow kit, as recommended by the manufacturer (BD). The DNA content was assessed using 7-AAD staining.

The cells were sorted on a FACS (INFLUX cell sorter, BD) at a pressure of 20–40 psi or analysed using a LSR II SORP flow cytometer (BD). Doublets were excluded on the basis of DNA dye fluorescence in the

The paper explained

PROBLEM:

A progressive cognitive decline occurs during aging and following cranial radiotherapy and is currently untreatable. A key element of this decline is the decreased production of new neurons by neural stem cells. However, mechanisms that underlie changes that occur in both stem cells and neurogenesis are poorly understood.

RESULTS:

One of our major findings is that a deficit in neurogenesis that is observed following high-dose radiation and during aging is due to alterations in the microenvironment that regulates stem cell fate rather than to a direct effect on the stem cells. Moreover, we have elucidated the molecular mechanism by which the

increased synthesis of TGF- β 1 by brain endothelial cells in the stem cell niche provokes stem cell dormancy and increases their susceptibility to apoptosis.

The second important finding is that the pharmacological blockade of TGF- β signalling restored the production of new neurons and their integration into the olfactory bulbs of irradiated and elderly mice.

IMPACT:

Our newly discovered mechanism should encourage the development of anti-TGF- β therapies for (i) limiting brain injury that is caused by radiotherapy or (ii) rejuvenating neurogenesis in elderly individuals with cognitive decline.

Height *versus* Wide graph. The FACS data were analysed using FlowJo software (Version 7.2.5).

Transplantation

CD24⁺CD31⁺CD45⁺GFP⁺ cells from the SVZs of GFP⁺ mice were sorted using FACS. These GFP⁺ cells formed neurospheres in the presence of EGF and FGF2. Immediately after FACS, 1 μ l of PBS that contained 10⁴ of CD24⁺CD31⁺CD45⁺GFP⁺ cells was administered transcranially at the following coordinates: AP = +0.75 mm, L = -1.1 mm and DV = -2.7 mm into anaesthetized C57Bl6 mice. The transplantations were performed using a small animal stereotaxic apparatus (Kopf model 900) with a 10 μ l Hamilton syringe and a 33 G needle (Hamilton, Bonaduz, Switzerland).

N-CFCA, neurosphere and adherent cultures

The neural colony-forming cell assays (NCFC-A; StemCell Technologies) were performed using freshly isolated SVZ cells, according to the manufacturer's instructions. After 21 days *in vitro*, the colonies were scored according to their size using an eyepiece reticule on an inverted light microscope under phase-contrast optics. Large (diameter \geq 1.5 mm) and small clones (diameter $<$ 1.5 mm) were considered to have derived from NSCs and TAPs, respectively (Louis et al, 2008). For the neurosphere cultures, freshly dissociated SVZ cells were plated in 6- or 12-well-plates with Neurocult complete medium (StemCell) that was supplemented with heparin (2 μ g/ml), EGF (20 ng/ml; Invitrogen) and FGF2 (10 ng/ml; Invitrogen). To test the effects of TGF- β 1 (1 ng/ml; R&D), it was added weekly at the time of passage. For the adherent cultures, freshly dissociated SVZ cells or neurosphere cells were plated on poly-D-lysine- (Sigma) or laminin- (Sigma) coated flasks. The cultures were incubated in a humidified atmosphere with 5% CO₂. The medium and growth factors were refreshed every 7 days.

Brain endothelial cells and co-cultures

Two sources of adult mouse BECs were used: primary CD31⁺CD45⁺ BECs for the qRT-PCR analyses (described in Cell sorting), and the bEnd3 cell line for the co-cultures. The bEnd3 cell line originated from

adult mouse BECs and was obtained from ATGC (CRL#2299). These cells were grown to a subconfluent monolayer in DMEM:F12 that was supplemented with 10% foetal calf serum. BEC monolayers were established 3–4 days before co-culture by plating 125 \times 10³ cells on 0.5% gelatine-coated Transwells. The BECs were irradiated at a dose of 5 Gy (0.6 Gy/min) in Transwells. Following exposure, the media was rinsed and the BECs were placed on the top of an adherent NSC culture in Neurocult complete medium.

Immunofluorescence and immunohistochemistry

Deeply anaesthetized animals received an intra-cardiac perfusion of 4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate (pH 7.4). The brains were post-fixed for 2 h in 4% PFA and cryoprotected in an incremental 10–30% sucrose/PBS gradient. Serial coronal cryostat sections were made (10 μ m for graft, and 30 μ m treatment experiments). The sections were incubated for 1 h in PBS with 0.3% Triton-X100–1% BSA or in PBS with 0.1% Tween20 (for Mash-1). The sections were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies (see Supporting Information Table 3 for the list of the primary antibodies). As it was difficult to localize TGF- β receptors *in situ*, immunofluorescences for T β R were performed on freshly dissociated SVZ cells. After three washes in PBS, the sections were incubated with AlexaFluor donkey secondary antibodies at 1:200 (Millipore). The sections were rinsed and mounted with DAPI Fluoromount-G (Southern Biotech).

The quantification of immunofluorescence

The immunofluorescence images were taken with 20 \times and 40 \times objectives using a Leica TCS SPE confocal microscope (Leica Application Suite, Leica Microsystems). Mosaic fluorescence images were obtained using a motorized microscope (Pathfinder, Imstar S.A., France) that was equipped with a Hamamatsu C8484-05G camera (Hamamatsu photonics, France) with NIS Elements software v3.1 (Nikon instruments, USA). For the BrdU and pyknotic nuclei analysis, the positive cells were counted from four to five consecutive sections that were separated by 140 μ m along the entire SVZ. The results are presented as an estimate of the total number of positive cells per SVZ

taking into the consideration the 140 μm spacing. The quantification of Dcx in OBs was performed by measuring fluorescence intensity using ImageJ software within a surface area that encompassed the RMS-OB.

Ultrastructural analysis of the SVZ

Deeply anaesthetized animals received an intra-cardiac perfusion with 4% PFA in 0.1 M sodium phosphate (pH 7.4) with 0.5% glutaraldehyde. After post-fixation overnight at 4°C, the brains were embedded in agarose and then cut into 50 μm sections using a VT 1200S vibratome (Leica, France). The sections that contained grafted GFP⁺ cells were selected using a LUMAR v1.2 stereoscope (Zeiss, France). Pre-embedding and GFP-immunogold staining were performed as described (Sirerol-Piquer et al, 2012). The sections were contrasted with 1% osmium and 7% glucose and embedded in araldite. Semi-thin 1.5- μm sections were prepared, selected at the light microscope level, and re-embedded for ultrathin sectioning at 70 nm. The sections were examined and photographed under a transmission electron microscope (FEI Tecnai, Hillsboro, OR, USA) using a digital camera (Morada, Soft Imaging System). The different SVZ cell types and the coverage of blood vessels with pericytes were quantified on 60–70 nm ultrathin sections that were stained with lead citrate and were examined under a transmission electron microscope. The different cell types within the SVZ, *i.e.* adjacent to the ventricle lumen, were counted at three different rostro-caudal levels (0–1 mm anterior to bregma). The coverage of 10 blood vessels per section within the SVZ was measured using UTHSCSA ImageTool software and expressed as the percentage of blood vessels perimeter covered by pericytes.

Western blots

The cells in the neurospheres or in the BEC co-cultures were harvested in lysis buffer (1% NP40, 20 mM Tris pH7.5, 150 mM NaCl, 10 mM glycerophosphate, 2 mM EGTA, 5 mM NaF and 1 mM sodium pyrophosphate) that was supplemented with Halt phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Scientific). The extracts were vortexed for 1 min and centrifuged at 20 000g for 10 min at 4°C. The soluble fraction was used for electrophoresis and immunoblotting. After spectrometric protein quantification, 40 μg of protein was loaded on a 10% acrylamide gel. Electrophoresis was performed at 30 V overnight. The membranes were blocked in 5% BSA/TBST buffer (20 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 0.1% Tween-20). The primary antibodies used are listed in the Supporting Information Table 3. The secondary HRP-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit antibodies (GE HealthCare) were used at 1:5000. Next, the membranes were subjected to chemiluminescence detection using SuperSignalWest Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Erembodegem, Belgium).

Quantitative PCR analysis

Total RNA was extracted from the sorted cells or total SVZ using Micro RNeasy plus isolation kits (Qiagen) and then reverse-transcribed using a high-capacity reverse transcription kit (Applied Biosystems). Q-PCR was performed on an ABI PRISM 7200 Sequence Detector System using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems); the specific primers are listed in Supporting Information Table 4. Each sample was normalized to endogenous Gapdh expression. Confirmation was also obtained from normalization with 18S. Each reaction was performed at least twice in duplicate.

Author contributions

MAM and FDB conceived the study. MAM and JRP designed experiments. The majority of the experiments were performed by JRP, with important contributions of MD, AC, KSF and MAM. JRP, MAM and FDB analysed the data. ACS and JMGV performed and interpreted the ultrastructural study. JRP, FDB and MAM wrote the manuscript.

Acknowledgements

We are indebted to JB Lahaye for the irradiation procedures, to C Joubert, V Neuville and all of the staff of the animal facilities; to I Baier, N Dechamps, H Benjelloun for cell sorting; and to T. Kortulewski for imaging facility. We also thank I Nesic and A Mabondzo for helping us with endothelial cell purification, V Barroca for treating the mice, C Alfaro-Cervello for initiating the electron microscopy experiments and A Van der Meeren for critical reading of the manuscript.

This study was supported by grants of ANR-SEST (Neurorad), Inca (Tetratips) and Electricité de France (EDF). JRP had a fellowship from Région Ile-de-France (DIM STEM-Pôle). The funders had no role in study design, data collection and analysis, the decision to publish, or the preparation of the manuscript.

Supporting Information is available at EMBO Molecular Medicine Online.

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Achanta P, Capilla-Gonzalez V, Purger D, Reyes J, Sailor K, Song H, Garcia-Verdugo JM, Gonzalez-Perez O, Ford E, Quinones-Hinojosa A (2012) Subventricular zone localized irradiation affects the generation of proliferating neural precursor cells and the migration of neuroblasts. *Stem Cells* 30: 2548–2560
- Ahlenius H, Visan V, Kokaia M, Lindvall O, Kokaia Z (2009) Neural stem and progenitor cells retain their potential for proliferation and differentiation into functional neurons despite lower number in aged brain. *J Neurosci* 29: 4408–4419
- Alvarez-Buylla A, Lim DA (2004) For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* 41: 683–686
- Battista D, Ferrari CC, Gage FH, Pitossi FJ (2006) Neurogenic niche modulation by activated microglia: transforming growth factor beta increases neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 23: 83–93
- Boche D, Cunningham C, Gaudie J, Perry VH (2003) Transforming growth factor-beta 1-mediated neuroprotection against excitotoxic injury in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* 23: 1174–1182
- Buckwalter MS, Yamane M, Coleman BS, Ormerod BK, Chin JT, Palmer T, Wyss-Coray T (2006) Chronically increased transforming growth factor-beta1 strongly inhibits hippocampal neurogenesis in aged mice. *Am J Pathol* 169: 154–164
- Calvo CF, Fontaine RH, Soueid J, Tammela T, Makinen T, Alfaro-Cervello C, Bonnaud F, Miguez A, Benhaim L, Xu Y, et al (2011) Vascular endothelial growth factor receptor 3 directly regulates murine neurogenesis. *Genes Dev* 25: 831–844
- Calvo W, Hopewell JW, Reinhold HS, Yeung TK (1988) Time- and dose-related changes in the white matter of the rat brain after single doses of X rays. *Br J Radiol* 61: 1043–1052

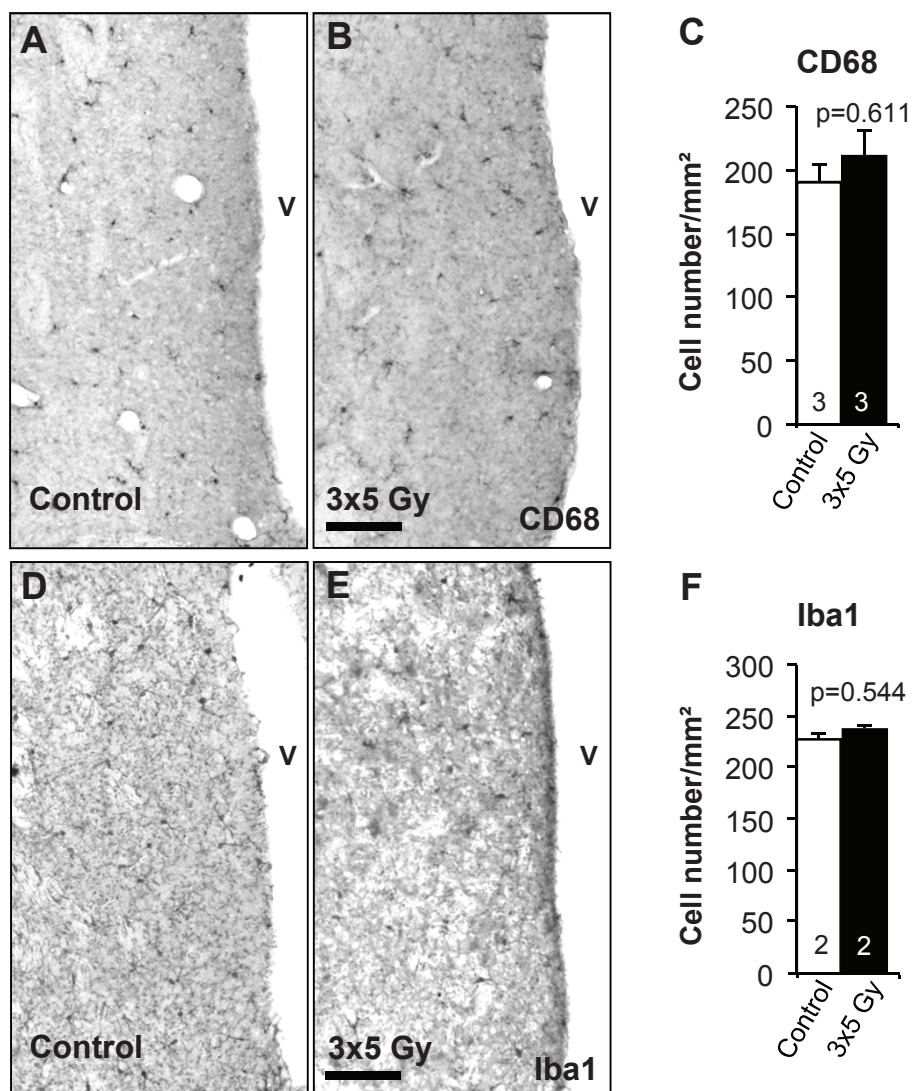
- Capela A, Temple S (2002) LeX/sea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal. *Neuron* 35: 865-875
- Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97: 703-716
- Enwere E, Shingo T, Gregg C, Fujikawa H, Ohta S, Weiss S (2004) Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signaling, diminished olfactory neurogenesis, and deficits in fine olfactory discrimination. *J Neurosci* 24: 8354-8365
- Gomes FC, Sousa Vde O, Romao L (2005) Emerging roles for TGF- β 1 in nervous system development. *Int J Dev Neurosci* 23: 413-424
- Hagedorn L, Floris J, Suter U, Sommer L (2000) Autonomic neurogenesis and apoptosis are alternative fates of progenitor cell communities induced by TGF β . *Dev Biol* 228: 57-72
- Han EK, Begemann M, Sgambato A, Soh JW, Doki Y, Xing WQ, Liu W, Weinstein IB (1996) Increased expression of cyclin D1 in a murine mammary epithelial cell line induces p27kip1, inhibits growth, and enhances apoptosis. *Cell Growth Differ* 7: 699-710
- Lazarini F, Mouthon MA, Gheusi G, de Chaumont F, Olivo-Marin JC, Lamarque S, Abrous DN, Boussin FD, Lledo PM (2009) Cellular and behavioral effects of cranial irradiation of the subventricular zone in adult mice. *PLoS ONE* 4: e7017
- Louis SA, Rietze RL, Deleyrolle L, Wagey RE, Thomas TE, Eaves AC, Reynolds BA (2008) Enumeration of neural stem and progenitor cells in the neural colony forming cell assay. *Stem Cells* 26: 988-996
- Lugert S, Basak O, Knuckles P, Haussler U, Fabel K, Gotz M, Haas CA, Kempermann G, Taylor V, Giachino C (2010) Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging. *Cell Stem Cell* 6: 445-456
- Maslov AY, Barone TA, Plunkett RJ, Pruitt SC (2004) Neural stem cell detection, characterization, and age-related changes in the subventricular zone of mice. *J Neurosci* 24: 1726-1733
- Massague J (2012) TGF β signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 616-630
- Mathieu C, Sii-Felice K, Fouchet P, Etienne O, Haton C, Mabondzo A, Boussin FD, Mouthon MA (2008) Endothelial cell-derived bone morphogenetic proteins control proliferation of neural stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci* 38: 569-577
- Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2008) Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell* 3: 265-278
- Monje ML, Palmer T (2003) Radiation injury and neurogenesis. *Curr Opin Neurol* 16: 129-134
- Monje ML, Toda H, Palmer TD (2003) Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* 302: 1760-1765
- Morshead CM, Craig CG, van der Kooy D (1998) In vivo clonal analyses reveal the properties of endogenous neural stem cell proliferation in the adult mammalian forebrain. *Development* 125: 2251-2261
- Mouthon M-A, Fouchet P, Mathieu C, Sii-Felice K, Etienne O, Silva Lages C, Boussin FD (2006) Neural stem cells from mouse forebrain are contained in a population distinct from the 'side population'. *J Neurochem* 99: 807-817
- Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y (1997) 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 407: 313-319
- Pastrana E, Cheng LC, Doetsch F (2009) Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 6387-6392
- Prediger RD, Aguiar AS, Jr, Rojas-Mayorquin AE, Figueiredo CP, Matheus FC, Ginestet L, Chevarin C, Bel ED, Mongeau R, Hamon M, et al (2010) Single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57BL/6 mice models early preclinical phase of Parkinson's disease. *Neurotox Res* 17: 114-129
- Ramirez-Castillejo C, Sanchez-Sanchez F, Andreu-Agullo C, Ferron SR, Aroca-Aguilar JD, Sanchez P, Mira H, Escribano J, Farinas I (2006) Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. *Nat Neurosci* 9: 331-339
- Schober A, Peterziel H, von Bartheld CS, Simon H, Kriegelstein K, Unsicker K (2007) GDNF applied to the MPTP-lesioned nigrostriatal system requires TGF- β for its neuroprotective action. *Neurobiol Dis* 25: 378-391
- Seoane J (2009) TGF β and cancer initiating cells. *Cell Cycle* 8: 3787-3788
- Seoane J, Le HV, Shen FL, Anderson SA, Massague J (2004) Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell* 117: 211-223
- Shen Q, Wang Y, Kokovay E, Lin G, Chuang SM, Goderie SK, Roysam B, Temple S (2008) Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell* 3: 289-300
- Sii-Felice K, Etienne O, Hoffschir F, Mathieu C, Riou L, Barroca V, Haton C, Arwert F, Fouchet P, Boussin FD, et al (2008) Fanconi DNA repair pathway is required for survival and long-term maintenance of neural progenitors. *EMBO J* 27: 770-781
- Sirerol-Piquer MS, Cebrian-Silla A, Alfaro-Cervello C, Gomez-Pinedo U, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM (2012) GFP immunogold staining, from light to electron microscopy, in mammalian cells. *Micron* 43: 589-599
- Tada E, Yang C, Gobbel GT, Lamborn KR, Fike JR (1999) Long-term impairment of subependymal repopulation following damage by ionizing irradiation. *Exp Neurol* 160: 66-77
- Tavazoie M, Van der Veken L, Silva-Vargas V, Louissaint M, Colonna L, Zaidi B, Garcia-Verdugo JM, Doetsch F (2008) A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* 3: 279-288
- Trnovec T, Kallay Z, Bezek S (1990) Effects of ionizing radiation on the blood brain barrier permeability to pharmacologically active substances. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 19: 1581-1587
- Tropepe V, Craig CG, Morshead CM, van der Kooy D (1997) Transforming growth factor- α null and senescent mice show decreased neural progenitor cell proliferation in the forebrain subependyma. *J Neurosci* 17: 7850-7859
- Valley MT, Mullen TR, Schultz LC, Sagdullaev BT, Firestein S (2009) Ablation of mouse adult neurogenesis alters olfactory bulb structure and olfactory fear conditioning. *Front Neurosci* 3: 51
- Villeda SA, Luo J, Mosher KI, Zou B, Britschgi M, Bieri G, Stan TM, Fainberg N, Ding Z, Eggel A, et al (2011) The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature* 477: 90-94
- Wachs FP, Winner B, Couillard-Despres S, Schiller T, Aigner R, Winkler J, Bogdahn U, Aigner L (2006) Transforming growth factor- β 1 is a negative modulator of adult neurogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol* 65: 358-370
- Werry EL, Enjeti S, Halliday GM, Sachdev PS, Double KL (2010) Effect of age on proliferation-regulating factors in human adult neurogenic regions. *J Neurochem* 115: 956-964
- Winkler EA, Bell RD, Zlokovic BV (2011) Central nervous system pericytes in health and disease. *Nat Neurosci* 14: 1398-1405
- Wyss-Coray T, Lin C, Sanan DA, Mucke L, Masliah E (2000) Chronic overproduction of transforming growth factor- β 1 by astrocytes promotes Alzheimer's disease-like microvascular degeneration in transgenic mice. *Am J Pathol* 156: 139-150
- Yingling JM, Blanchard KL, Sawyer JS (2004) Development of TGF- β signalling inhibitors for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 3: 1011-1022

Supplementary informations for:

Vascular-derived TGF- β increases in the stem cell niche and perturbs neurogenesis during aging and following irradiation in the adult mouse brain

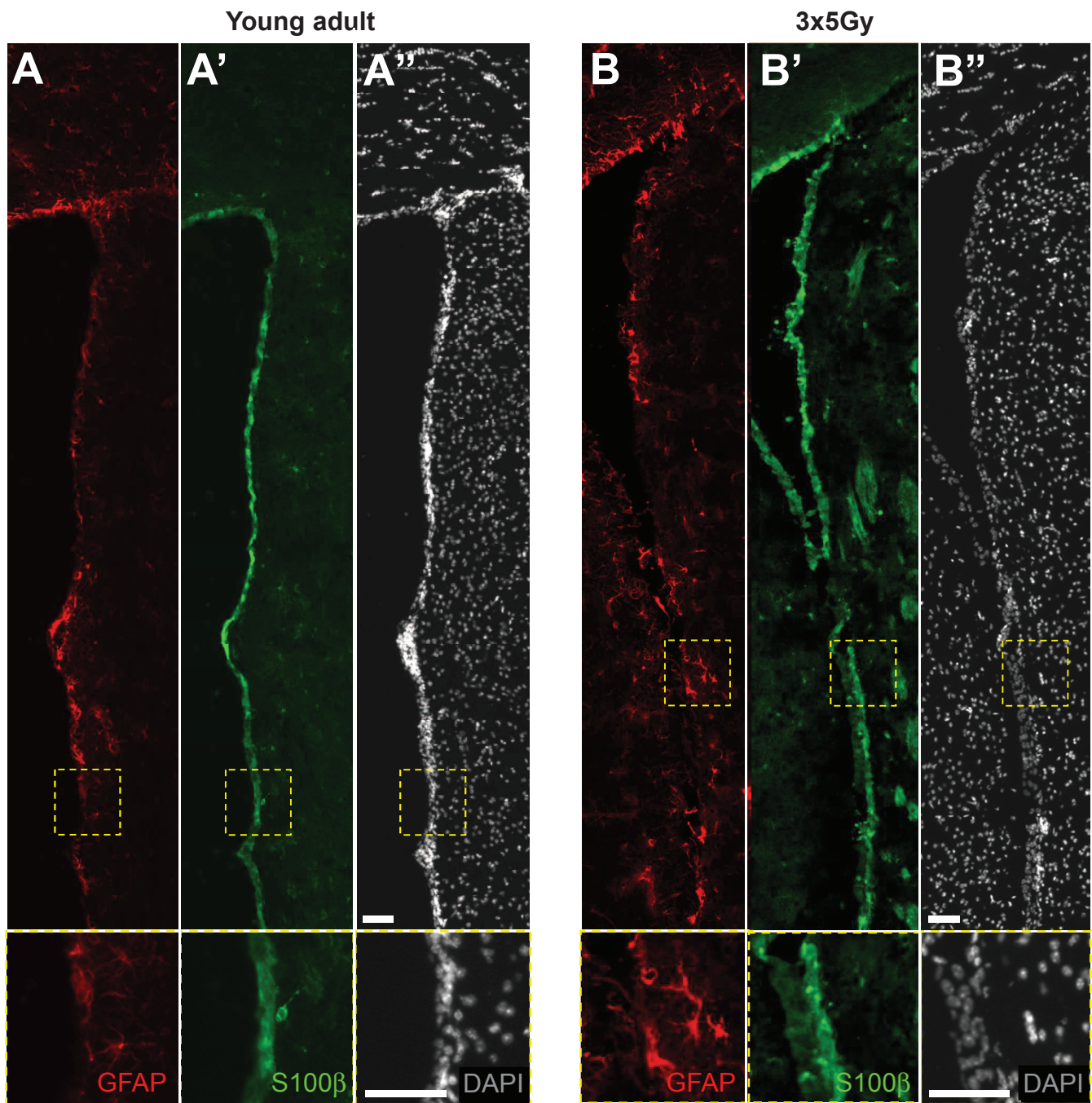
Jose R. PINEDA, Mathieu DAYNAC, Alexandra CHICHEPORTICHE, Arantxa CEBRIAN-SILLA, Karine SII FELICE, Jose Manuel GARCIA-VERDUGO, François D. BOUSSIN and Marc-André MOUTHON

Supplementary information	Content
Supplementary Figure 1:	Split dose radiation does not mobilize microglial cells
Supplementary Figure 2:	Cells that resemble NSCs are present in the irradiated brain
Supplementary Figure 3:	Irradiation blocks proliferation in the SVZ
Supplementary Figure 4:	FACS strategy for NSC sorting and analysis
Supplementary Figure 5:	NSCs with a GLAST ⁺ CD24 ⁻ phenotype are maintained in the SVZ following irradiation
Supplementary Figure 6:	Grafted NSCs differentiate into neurons and migrate in the OBs
Supplementary Figure 7:	Phospho-Smad2 is undetectable in the SVZ
Supplementary Figure 8:	Irradiated BECs induce neural progenitor apoptosis through TGF β
Supplementary Figure 9:	The inhibitory effect of TGF β 1 on neurosphere growth is blocked by treatment with an anti-TGF β blocking antibody
Supplementary Figure 10:	Alteration of mural coverage with anti-TGF β therapy
Supplementary Figure 11:	SB-505124 increases production of neuroblasts and proliferation of NSCs in both irradiated and elderly mice
Supplementary Table 1:	Phenotype of TGF β -positive cells in SVZ
Supplementary Table 2:	P-values for TGF β -binding on SVZ cells as compared to young adult mice
Supplementary Table 3:	Primary antibodies
Supplementary Table 4:	Primer sequences



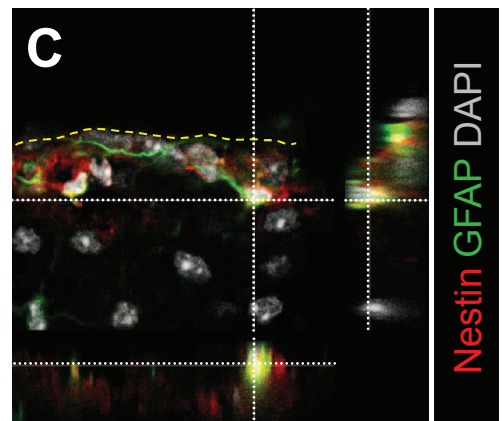
Supplementary Figure 1: Split dose radiation does not mobilize microglial cells

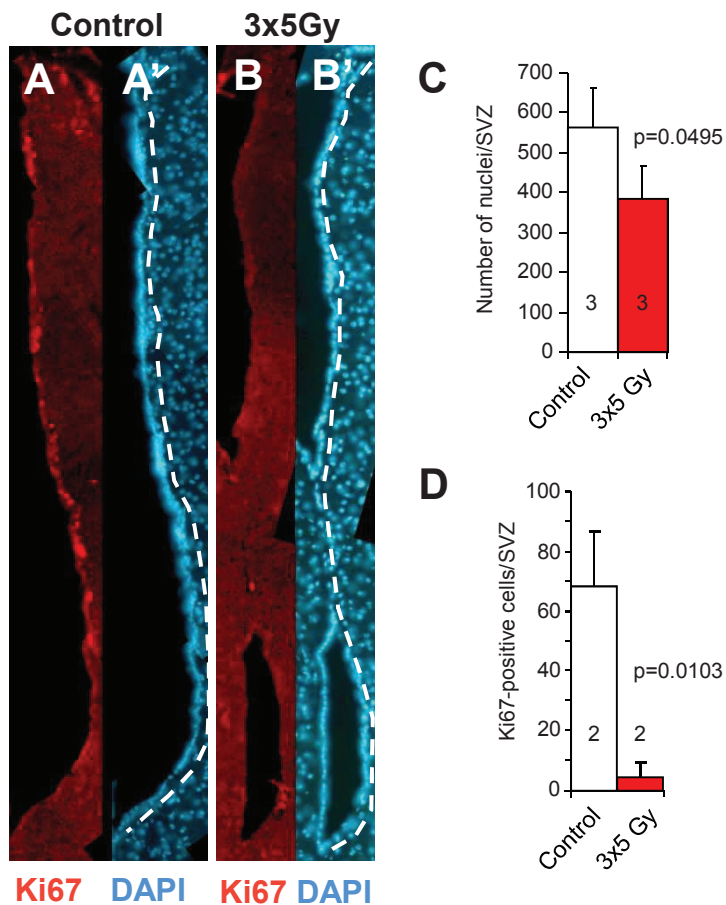
Immunohistochemistry for CD68 (A-C) and Iba1 (D-F) revealed microglial cells in a region that encompassed the proximal striatum and the SVZ of control (A and D) and irradiated mice 2 months following exposure (B and E). Quantifications (mean \pm s.d.) of CD68-positive cells (C) and Iba1 (F) revealed that the 3x5 Gy split-exposure does not mobilise microglial cells into the brain. Scale bars = 100 μ m. V: ventricle. The p -value was determined using the Mann–Whitney U-test. The number of mice is indicated within bars.



Supplementary Figure 2: Cells that resemble NSCs are present in the irradiated brain

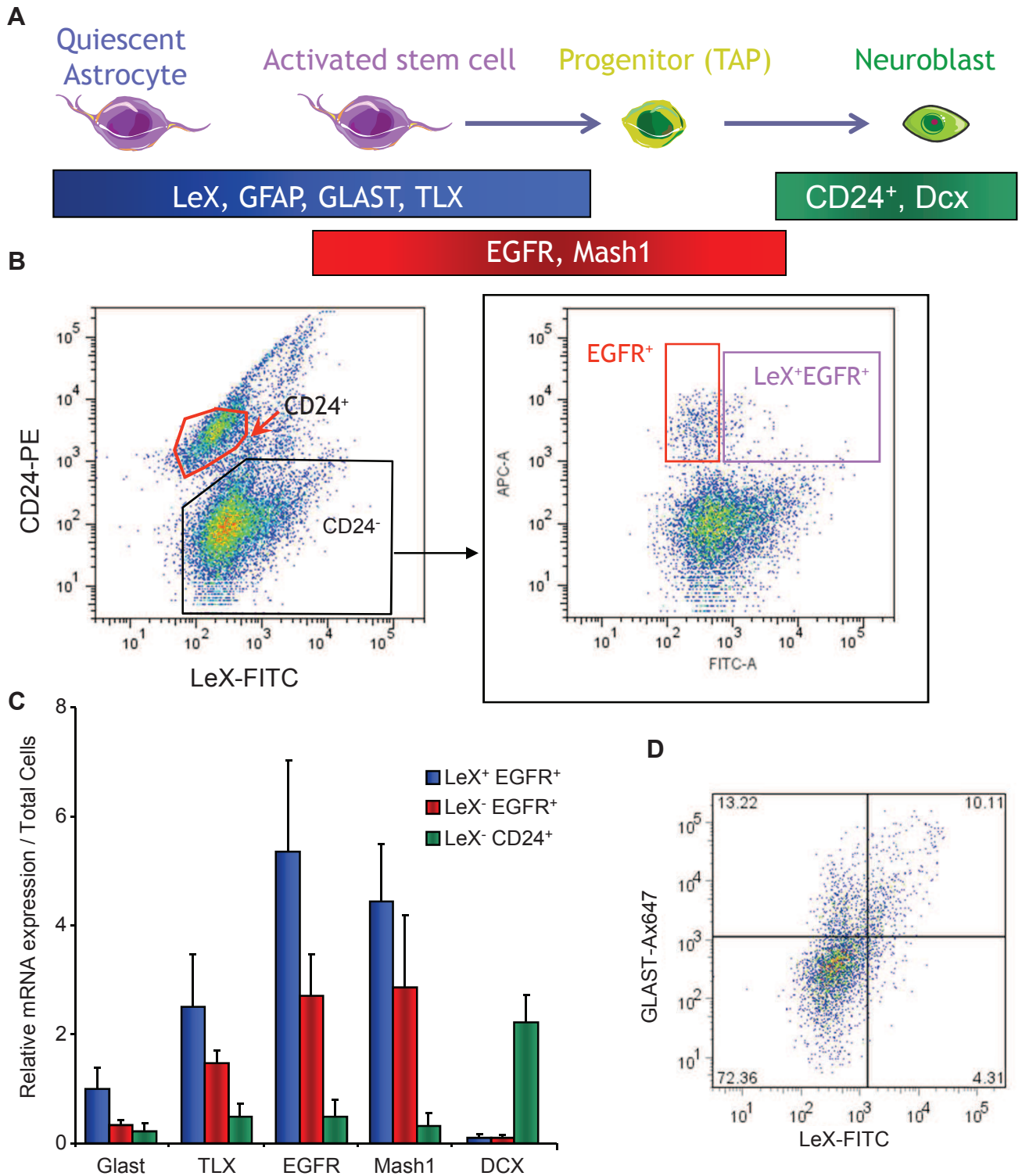
In control mice, NSCs lining lateral ventricle are characterised by their positivity for GFAP (A) and negativity for S100 β (A') a marker associated with differentiated astrocytes and ependymal cells. Certain NSCs survived in the SVZ 4 months following irradiation (B-B''). The survival of astrocytic-like NSCs was confirmed by nestin/GFAP double immunostaining (C). Scale bars = 100 μ m.





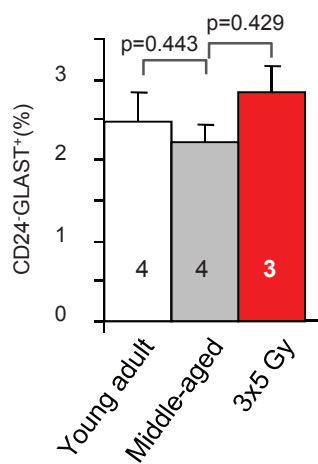
Supplementary Figure 3: Irradiation blocks proliferation in the SVZ

Ki-67 immunostaining and nuclei staining with DAPI indicated that cell proliferation was profoundly reduced in the SVZ 4 months following exposure (B, B') in comparison to the control mice (A, A'). The mean \pm s.d. are shown in C and D. The p-value was determined using the Mann–Whitney U-test. The number of mice is indicated within bars.



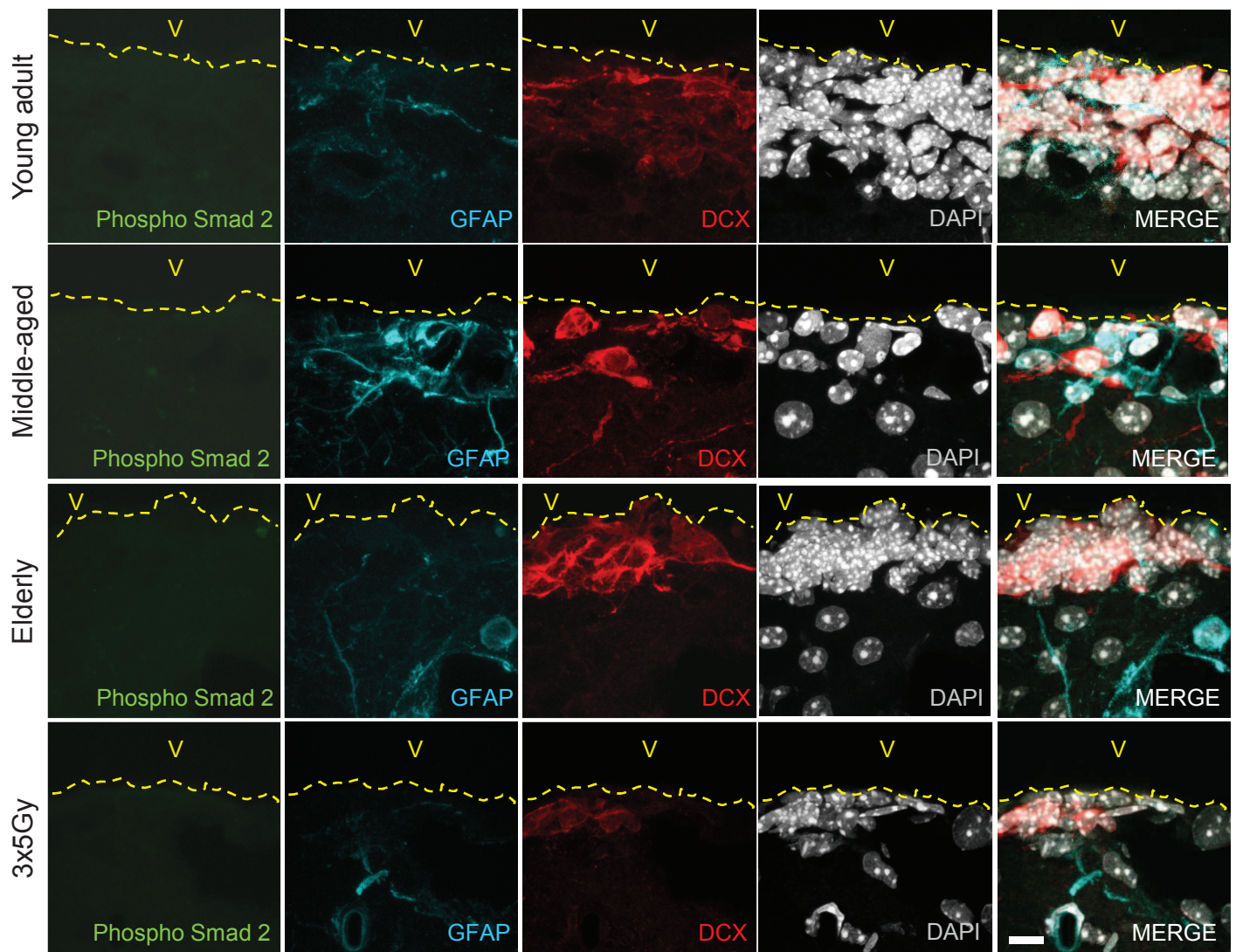
Supplementary Figure 4: FACS strategy for NSC sorting and analysis

(A) Schematic representation of NSCs and their progeny in the SVZ, and the expression of several markers. (B) Sorting gates are represented for the neuroblasts (CD24⁺), activated NSCs (CD24⁻LeX⁺EGFR⁺) and TAPs (CD24⁻LeX⁺EGFR⁻). (C) The expression of specific markers for NSCs, TAPs and neuroblasts was examined for sorted populations by qRT-PCR. The mean \pm s.d. were obtained from pooled samples with $n = 8-10$ mice in three independent sorting experiments. (D) FACS analysis of CD24⁻ cells in the SVZ showed that nearly all of the LeX⁺ cells express GLAST, although a subset of GLAST⁺ cells were observed to be LeX-negative.



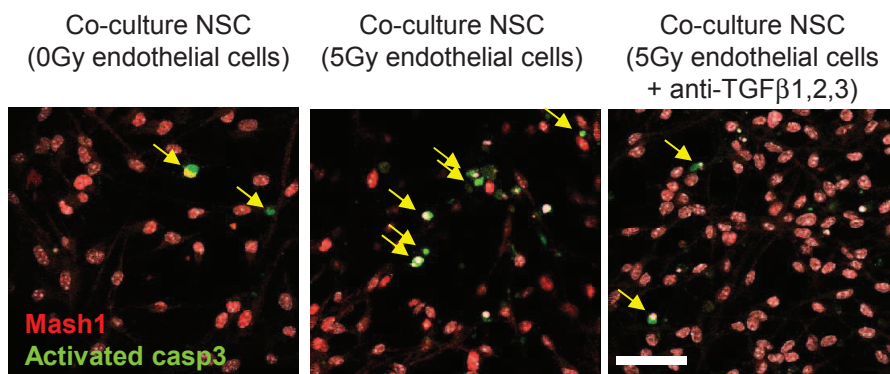
Supplementary Figure 5: NSCs with a CD24-GLAST⁺ phenotype are maintained in the SVZ following irradiation and during aging

The quantification of CD24-GLAST⁺ in the SVZ by FACS in young adult (2-4 months), middle-aged (12 months) and young adult mice 3-4 months after the 3x5 Gy split-dose irradiation. The mean \pm s.d. is shown (the number of mice is indicated within the bars). The *p*-value was determined using the Mann-Whitney U-test.



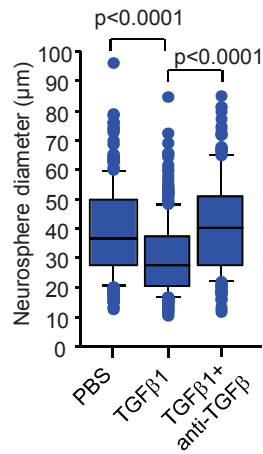
Supplementary Figure 7: Phospho-Smad2 is undetectable in the SVZ

Triple immunostaining for phospho-Smad 2, GFAP and doublecortin (DCX) allows for the examination of neurogenic niches in the SVZ (V: lateral ventricle). Smad2 phosphorylation was undetectable. The illustrations are representative of three different experiments, with three mice per group. Scale bar = 10µm.



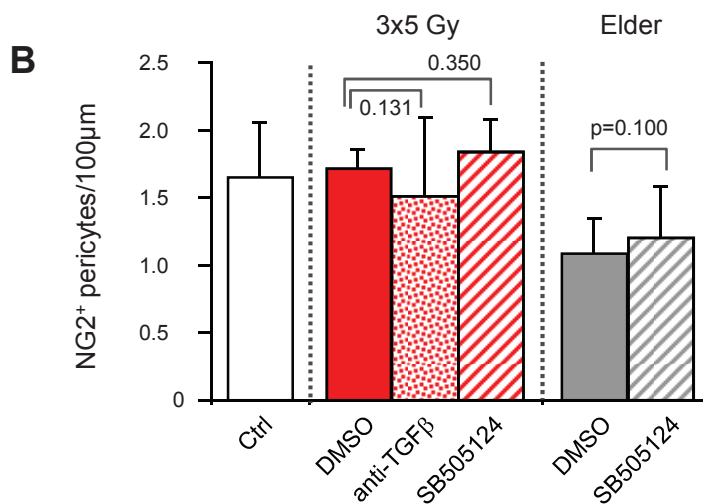
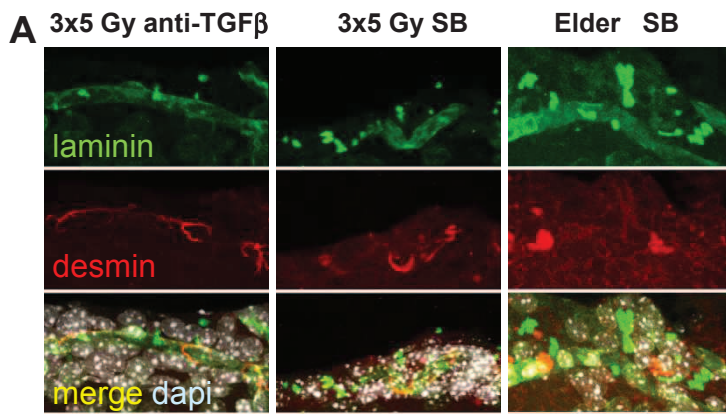
Supplementary Figure 8: Irradiated BECs induce neural progenitor apoptosis via TGF β

Apoptosis (activated caspase 3) of Mash1-positive neural stem/progenitor cells in co-culture with irradiated endothelial cells was reduced following treatment with a blocking anti-TGF β antibody. Scale bar = 50 μ m.



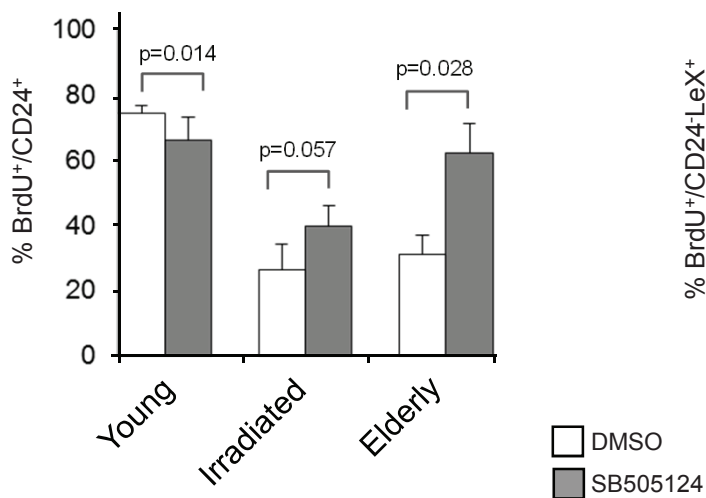
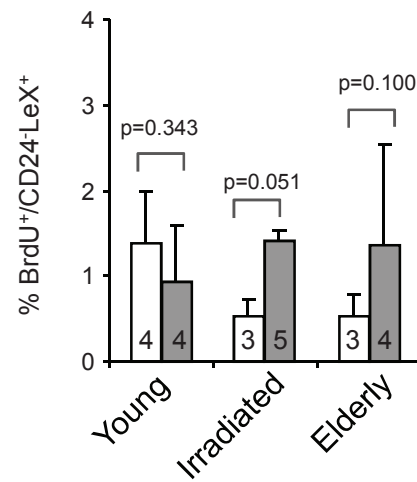
Supplementary Figure 9: The inhibitory effect of TGFβ1 on neurosphere growth is blocked by treatment with an anti-TGFβ blocking antibody

The neurosphere size was determined 7 days following the addition of TGFβ1 (1 ng/ml) in the presence or absence of an anti-TGFβ blocking antibody. The mean ± s.d. was obtained from at least 248 neurospheres per condition in two individual cultures. The *p*-value was determined using Student's *t*-test.



Supplementary Figure 10: Alteration of mural coverage with anti-TGF β therapy

(A) The effects SB-505124 or of the anti-TGF β blocking antibody were examined on mural coverage of SVZ capillaries using desmin/laminin immunostainings. (B) NG2/pericytes were quantified on SVZ capillaries. Scale bar: 50 μ m. The mean \pm s.d. of two independent experiments is shown. The p -value was determined using the Mann–Whitney U-test.

A New BrdU⁺CD24⁺ neuroblasts**B** Cycling NSCs**Supplementary Figure 11: SB-505124 increases production of neuroblasts and proliferation of NSCs in both irradiated and elderly mice**

SB-505124 was administered for 5 days in young adult, irradiated or elderly mice. The mice were euthanised one day after the final treatment. The incorporation of BrdU was determined by FACS analysis of CD24⁺ neuroblasts (A) and of CD24⁺LeX⁺ NSCs (B). The mean \pm s.d. of two independent experiments is shown (the number of mice is indicated within bars). The *p*-value was determined using the Mann–Whitney U-test.

Supplementary Table 1: Phenotype of TGFβ-positive cells in SVZ

Cycling DNA>2N	Nblast CD24 ⁺	TAPs EGF ⁺	Activated NSCs LeX ⁺ EGF ⁺ CD24 ⁻	NSCs GLAST ⁺ CD24 ⁻
4 ± 1%	3 ± 2%	17 ± 2%	48 ± 2%	27 ± 4%

Supplementary Table 2: P-values for TGFβ-binding on SVZ cells compared to young adult mice

	Middle-aged	Elder	3x5 Gy
Neuroblasts	0.564	0.564	>0.999
Cycling	0.147	0.020	0.020
TAPs	>0.999	0.439	0.439
NSCs	0.121	0.121	0.439

Supplementary Table 3: Primary antibodies

Target	Host	Clone/ref	Dilution	Provider
GFAP	Ms	GA5	400	Millipore
Id1	Ms	7D4	100	Millipore
NeuN	Ms	A60	100	Millipore
Sox2	Ms	6F1.2	100	Millipore
Cyclin D1	Rb	06-137	200	Millipore
p21waf	Ms	Clone 65	100	Millipore
Smad2/3	Rb	071408	2000 ^a	Millipore
GFP	Rb	Ab290	200/1000 ^b	Abcam
TGFb1	Ms	2Ar2	50/500 ^a	Abcam
phospho-Smad3 (S423/425)	Rb	ab51451	100/1000 ^a	Abcam
TGFb receptor I	Rb	ab31013	100	Abcam
TGFb receptor II	Rb	ab61213	100	Abcam
phospho-Smad2 (S465/467)	Rb	mAb3101	100	Cell Signalling
cleaved caspase-3	Rb	mAb9579	100	Cell Signalling
Laminin	Rb	L9393	50	Sigma-Aldrich
Desmin	Ms	D33	150	Dako
NG2	Ms	AB5320	150	Millipore
a-tubulin	Ms	DM1A	1000 ^a	Sigma-Aldrich
GFAP	Rb	G9269	400	Sigma-Aldrich
bIII-tubulin	Rb	PRB-435P	200	Covance
Ki-67	Ms	MM1	100	Covance
Nestin	Ms	Rat401	200	Becton Dickinson
Mash1	Ms	24B7.2D11	50	Becton Dickinson
CD15/LeX	Ms	MMA	100	Becton Dickinson
CD68	Rat	FA-11	100	AbDSerotec
S100b	Rb	Z0311	200	Dako
BrdU	Ms	RPN202	300	GE Healthcare
Doublecortin	Goat	C-18	200	SantaCruz
CD24-PE	Rat	30-F1	500	Becton Dickinson
LeX/CD15-FITC	Ms	MMA	50	Becton Dickinson
CD31-PE	Rat	MEC13.3	50	Becton Dickinson
CD45-PC5 or PE	Rat	30-F11	50	Becton Dickinson
GLAST	Rat	ACSA-1	50	Miltenyi

^aDilution is given for western blot. ^bDilution is given for DAB revelation.

Supplemental Table 4: Primer sequences

Target gene	Forward primer 5' → 3'	Reverse primer 5' → 3'
Gapdh	CCAGTATGACTCCACTCACG	GACTCCACGACATACTCAGC
18S	ATACATGCCGACGGGCGCTG	AGGGAGCTCACCGGGTTGGTT
Tlx	ATGCCCCGTAGACAAGACAC	CGGAAGTAGAGAGCCACCTG
Mash1	TGTCTTTCCTCAGTCACCCC	GAAAGGCTGTCCGAGAACTG
Dcx	TCCCCAACACCTCAAAAGAC	TTGAGAGCTGACTGCTGGAA
TGFβ1	GGTGTGAGAGCCTCACCGCG	AGAGCGGGAACCCTCGGCAA

Primers were purchased from Eurogentec.

ARTICLE 4 :

TGF- β lengthens G1 phase of stem cells in aged brain

Mathieu Daynac, Jose R. Pineda, Alexandra Chicheportiche, Laurent R. Gauthier,
Francois D. Boussin, Marc-André Mouthon

Soumis dans

Dans la suite de mon projet, je me suis focalisé sur l'influence du TGF β sur le vieillissement des niches neurogéniques. On est parti d'un résultat initialement observé lors de la préparation de l'article n°3 (Pineda et al., 2013). En utilisant une technique de comptage des cellules totales peuplant la ZSV associée au tri des différentes populations de la ZSV mise au point dans l'article n°2 (Daynac et al., 2013), nous avons observé que :

- Le stock de CSN (CSN quiescentes LeXbright et CSN activées LeX+EGFR+ reste constant entre 2 et 12 mois, et commence à décroître après 12 mois (figure 14)
- En revanche, le stock de cellules de progéniteurs (EGFR+) et de neuroblastes (CD24+EGFR+ et CD24+) décroît progressivement, ainsi que le nombre total de cellules peuplant la ZSV (Figure 15)

Si on regarde la proportion de cellules dont le contenu en ADN est supérieur à 2N (i.e les cellules en S-G2/M) parmi chaque population, on remarque que :

- les LeX+EGFR+ ont une proportion de cellules en S-G2/M qui diminue sensiblement entre 2 et 12 mois (fig. 15C)
- En revanche, la proportion de cellules EGFR+ et neuroblastes en prolifération est moins affectée, malgré une légère diminution à 12 mois.

Ainsi, le stock de CSN reste constant entre 2 et 12 mois mais la proportion de CSN activées en prolifération diminue sensiblement, alors que le stock de progéniteurs diminue fortement mais ces derniers gardent leur capacité à proliférer. Ce constat suppose qu'un problème d'entrée en phase S des CSN activées pourrait être un évènement majeur et initiateur provoquant le déclin de la neurogenèse avec l'âge.

Nous avons donc décidé pour la rédaction de l'article de comparer des groupes de souris de 2 mois à des souris de 12 mois où le déficit de prolifération des CSN activées semble le plus marqué.

Nous avons tout d'abord comparé la capacité des CSN jeunes et âgées à repeupler la ZSV dans notre modèle de reprise de la neurogenèse après irradiation 4Gy mis au point dans l'article n°2 (Daynac et al., 2013). Nous remarquons (Figure 16) :

- Un retard de la reprise de la neurogenèse après irradiation chez les souris âgées où les cellules commencent à proliférer 96h après irradiation (contre 48h chez les jeunes)
- Ensuite, les pentes de croissance des populations de neuroblastes sont similaires.

Ces résultats confirment une réduction de la prolifération *in vivo* au stade souche/progéniteur chez les souris âgées. Nous avons donc décidé de comparer *in vitro* le temps de cycle des CSN activées et des TAC jeunes et âgées par vidéomicroscopie. Dans l'analyse de la durée totale de cycle cellulaire, nous remarquons que :

- Les CSN activées (LeX+EGFR+) âgées ont un cycle cellulaire plus long que les jeunes, et engendrent des neurosphères plus petites 96h après ensemencement.
- En revanche, les TAC (EGFR+) de souris âgées ont un temps de cycle cellulaire similaire aux jeunes et engendrent des neurosphères de taille similaire.

Ainsi, la perturbation du cycle cellulaire est spécifique aux CSN activées chez les souris âgées. Afin de visualiser plus en détail quelles phases du cycle qui sont perturbées, nous avons utilisé des souris transgéniques Fucci Rouge (Sakaue-Sawano et al., 2008), dont les cellules fluorescent en rouge pendant la phase G1, et sont incolores pendant les autres phases du cycle cellulaire.

- Les CSN activées LeX+EGFR+ âgées ont une phase G1 plus longue que les LeX+EGFR+ jeunes, sans que la durée des phases S-G2/M ne soit altérée.
- La durée des phases G1 et S-G2/M est similaire pour les cellules EGFR+ quel que soit l'âge.

Le vieillissement dans la ZSV induit un allongement spécifique de la phase G1 des CSN activées, sans que celles-ci soient bloquées puisqu'elles engendrent des neurosphères *in vitro*. L'augmentation de la production de TGF β -1 par les cellules endothéliales (Pineda et al., 2013) (article n°3) perturbe la neurogenèse au cours du vieillissement et la voie de signalisation TGF β est connue pour induire un arrêt en G1 dans des lignées cancéreuses (Song et al., 2006) (Gadir et al., 2007). Il apparaît donc logique d'imaginer que la voie TGF β puisse être impliquée dans cet allongement spécifique de la phase G1 des CSN activées au cours du vieillissement.

En effet :

- Un traitement avec le TGF β -1 *in vitro* allonge la phase G1 des CSN activées (LeX+EGFR+) ainsi que des TAC (EGFR+) chez les souris jeunes, sans altérer la durée de S-G2/M.
- Le blocage de la voie TGF β *in vitro* et *in vivo* réduit la durée de phase G1 des CSN activées (LeX+EGFR+) spécifiquement, sans perturber le cycle des TAC (EGFR+).

Ainsi, la voie TGF β est directement impliquée dans l' allongement de la phase G1 des CSN activées. Cette perturbation du cycle cellulaire des CSN activées par TGF β 1 semble être un évènement majeur entraînant le déclin de la neurogenèse au cours du vieillissement. Le développement d'une thérapie anti-TGF β *in vivo* pourrait permettre de rétablir la neurogenèse des individus âgés et éventuellement recouvrir certaines fonctions cognitives perdues au cours du vieillissement.

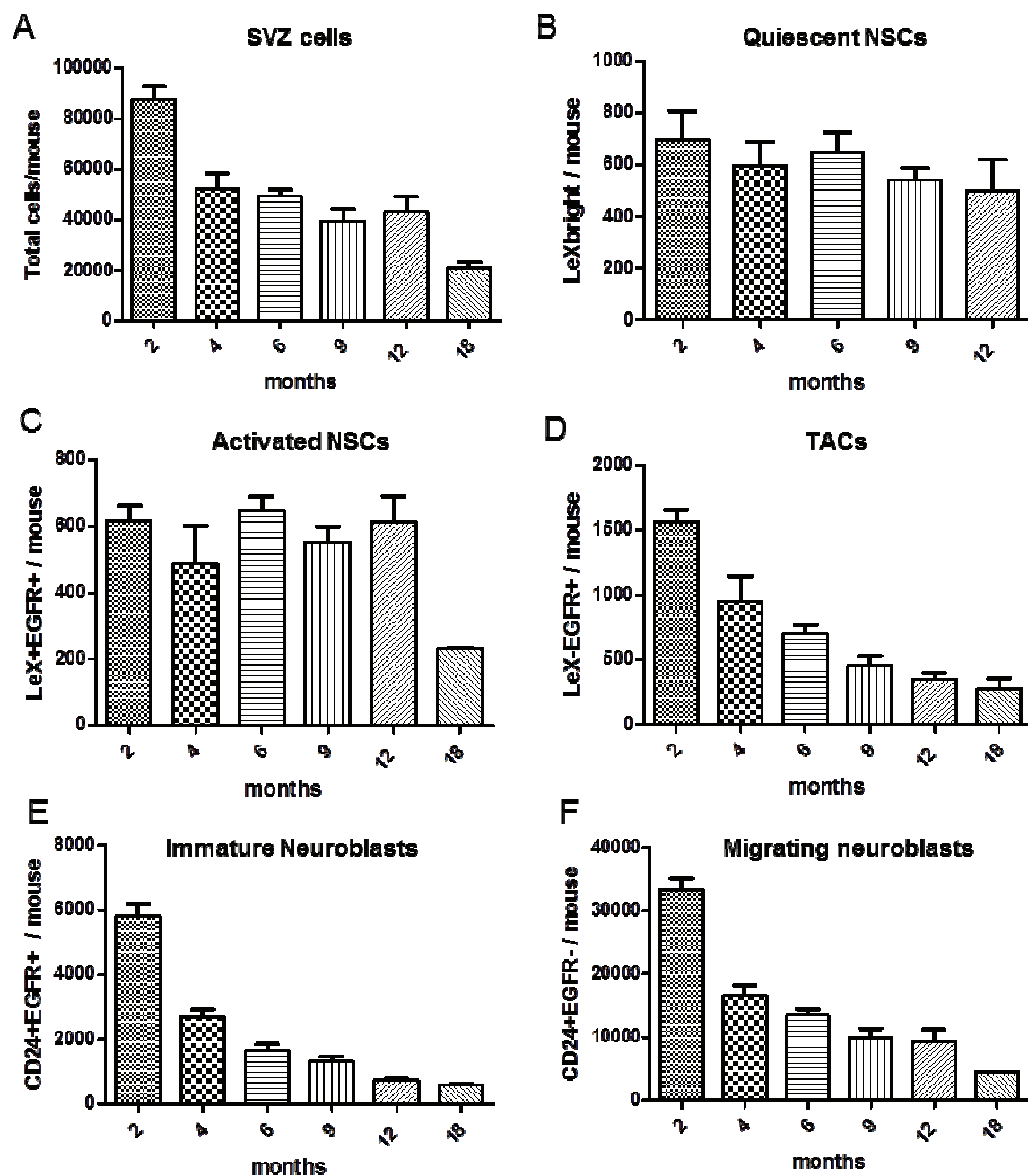


Figure 14 : Evolution du stock de cellules peuplant la ZSV au cours du vieillissement

(A-F) Evolution du nombre de cellules totales ainsi que des populations neurogéniques principales peuplant la ZSV entre 2 et 18 mois.

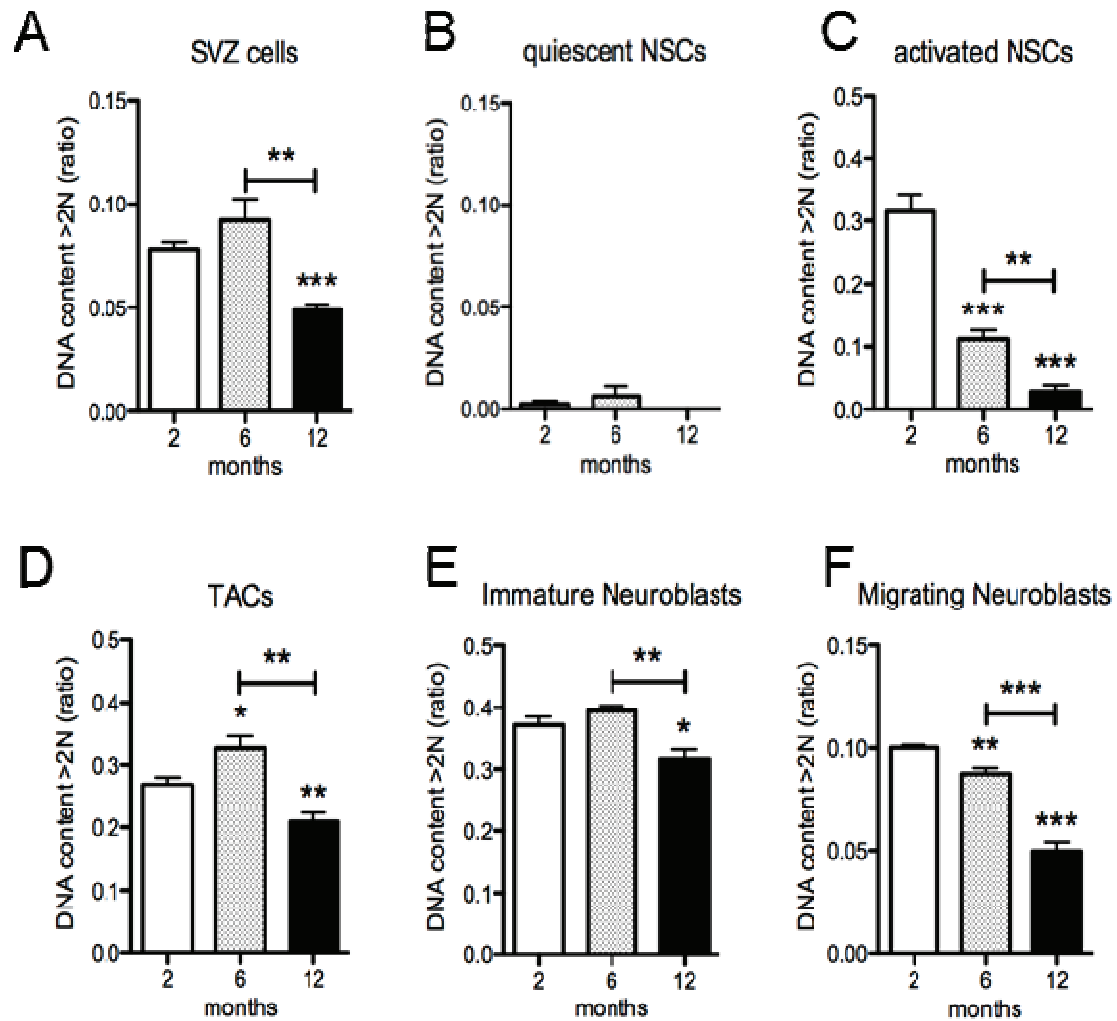


Figure 15 : Evolution de la proportion de cellules en S-G2/M parmi les populations peuplant la ZSV au cours du vieillissement

(A-F) Evolution de la proportion de cellules au contenu en ADN supérieur à 2N parmi les principales populations neurogéniques peuplant la ZSV entre 2 et 12 mois.

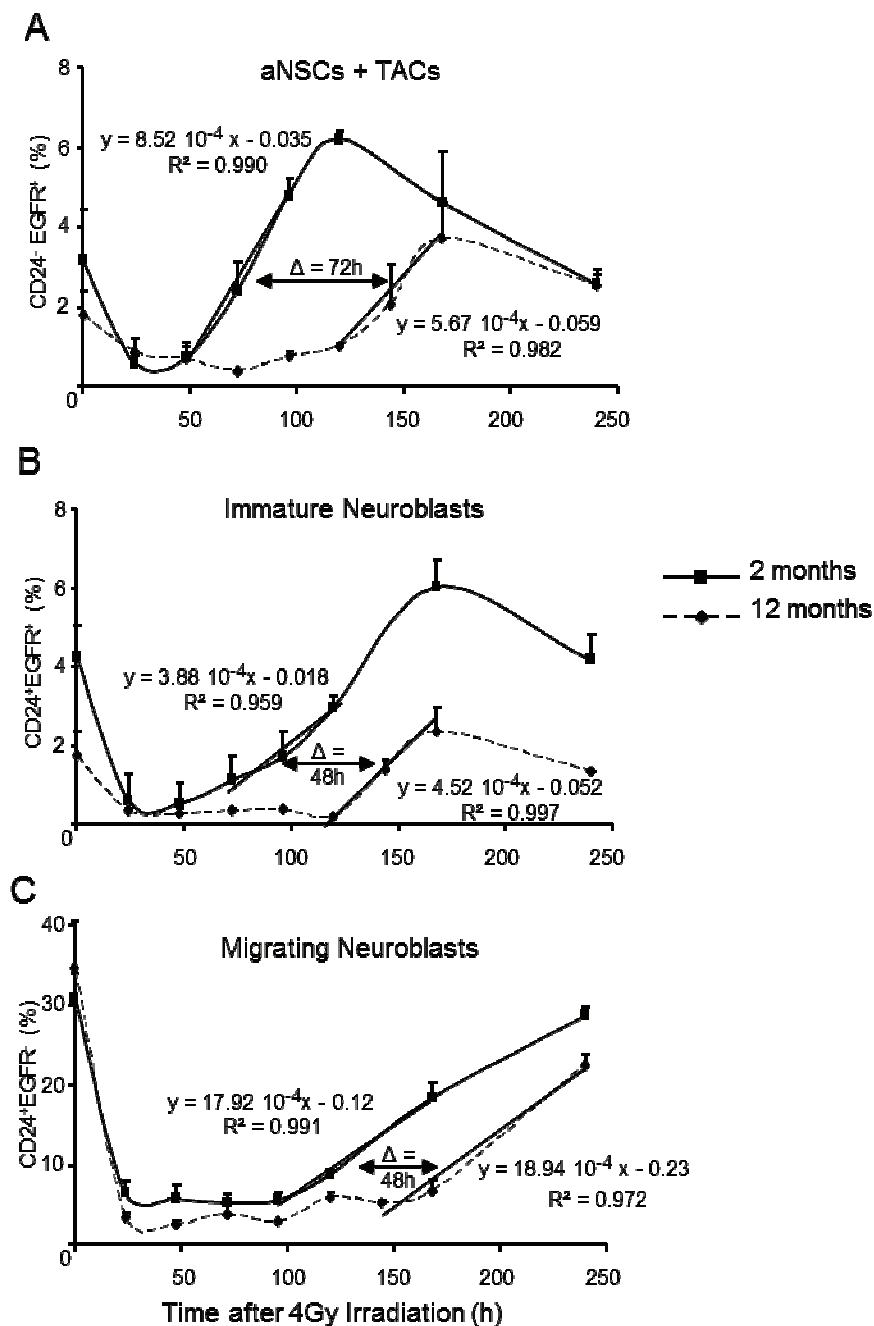


Figure 16 : Reprise de la neurogenèse après irradiation (4Gy) dans les jeunes adultes (2 mois) et les adultes d'âge moyen (12 mois)

(A) La récupération des CSN activées et des cellules de type C est décalée de 72h entre les jeunes adultes et les adultes d'âge moyen. Ensuite, la neurogenèse semble reprendre normalement chez les souris âgées et l'écart se stabilise à 48h (B), (C)

TGF β lengthens G1 phase of stem cells in
aged brain

Introduction

The production of new neurons, a process called neurogenesis, persists during adulthood and is ensured by neural stem cells (NSCs) that are located in restricted region of mammal brains: the subgranular zone (SGZ) of the dentate gyrus in the hippocampus and the subventricular zone (SVZ) lining the lateral ventricles. In the adult SVZ, NSCs successively give rise to transit amplifying cells (TACs) and to neuroblasts that migrate in chains to the olfactory bulbs (OB), where they differentiate into neurons and contribute to olfactory functions (Doetsch et al, 1999) (Lois & Alvarez-Buylla, 1994) (Alonso et al, 2006) (Lepousez et al, 2013). However, neurogenesis is greatly reduced during aging in both SVZ and SGZ (Kuhn et al, 1996) and this might correlate with some age-associated cognitive deficits (Cimadamore et al, 2011; Enwere et al, 2004). Studies demonstrate that the reduction in neurogenesis in the SVZ and in the SGZ during aging is due to the decrease in proliferation of neural progenitors that include NSCs and TACs. A significant decline in proliferation *in vivo* of progenitor cells is apparent by mid-age in mice, i.e. 12 months old, ultimately resulting in a dramatic reduction in elderly mice (Blackmore et al, 2009; Tropepe et al, 1997) (Bouab et al, 2011; Enwere et al, 2004).

Despite all authors agree that adult forebrain neurogenesis is highly diminished during aging, mechanisms are still elusive and it is still not known whether age results of a loss of NSC and TAC levels or if their proliferation is compromised (Hamilton et al, 2013). In addition, conflicting results concerning the lengthening of the neural progenitor cell cycle during aging were obtained (Tropepe et al, 1997) (Enwere et al, 2004). The decrease in proliferating progenitors could be explained by an exhaustion of NSC pool (Maslov et al, 2004) (Shook et al, 2012). Indeed, studies suggest that NSCs may be programmed for a limited number of divisions with a limited self-renewal capacity (Balordi & Fishell, 2007) (Sii-Felice et al, 2008). On the other hand, the capacity of NSCs to proliferate is altered during aging. When isolated from aged mouse SVZ, neural progenitors retain their *in vitro* capacity to proliferate and differentiate into functional neurons, similarly to progenitors from young adult mice, albeit with lower efficacy (Ahlenius et al, 2009) (Maslov et al, 2004) (Tropepe et al, 1997) (Blackmore et al, 2009). Progenitors from middle-aged mice presented already a two-fold decrease in the capacity to form neurospheres (Blackmore et al, 2009). Moreover, recent studies have proposed the transition of proliferating NSCs to a quiescent state (Bouab et al, 2011) (Lugert et al, 2010). Aging-associated decrease in EGFR signaling, a major pathway

for NSCs (Doetsch et al, 2002), has been reported in neural progenitors (Tropepe et al, 1997) (Blackmore et al, 2009).

Recently, we have shown that the increase in TGF β in middle-aged mice is an inhibitory signal for NSC proliferation in SVZ niches (Daynac et al, 2013). Interestingly, the blockade of TGF β signalling increases NSC proliferation and allows for NSCs neurogenesis to efficiently recover in the mice middle-aged mice SVZ (Daynac et al, 2013); but the exact mechanism and the target progenitors are elusive.

Neural progenitors are maintained thanks/owing to relatively quiescent NSCs that can enter the cell cycle and convert into EGFR-expressing activated NSCs, particularly when SVZ repopulate after depletion from proliferating cells (Morshead et al, 1994) (Doetsch et al, 1999). The detection by FACS of EGFR expression combined with NSC markers has been used to overcome the difficulties to distinguish the various NSC populations and their progeny in the SVZ, as well as, to sort prospectively these populations (Daynac et al, 2013; Pastrana et al, 2009).

An important question about the age-related decline in neurogenesis that remains unanswered concerns whether there is intrinsic suppression of NSC proliferation or whether the decline is due to lack of trophic support and deficits in the neurogenic niche; the alteration of NSC pool is still a matter of debate (Reviewed by (Hamilton et al, 2013). Resolving which of these regulatory mechanisms is involved, or whether there is a relative contribution of all elements, will be necessary for advancing therapeutic stimulation of aging NSCs. Herein, we observed that the pools of quiescent and activated NSC remained unaltered in the SVZ from middle-aged mice. Furthermore, we demonstrate that the decrease in proliferation during aging in the SVZ roots in the lengthening of the G1 phase of activated NSCs. This G1 lengthening is controlled by TGF β signaling that opposes EGFR signaling.

Results

Stem cells are preserved during aging but have a strong proliferation defect

The decline in neurogenesis accompanied by the decrease in number of proliferating cells and of neuroblasts in the SVZ has been reported to occur already in middle-aged mice, i.e. before the senescence process occurs (Bouab et al, 2011) (Shook et al, 2012). As expected, we observed that the total number of cells freshly dissociated from SVZ was reduced by two-fold in middle-aged mice (12 months) in comparison to young adults (2 months) as estimated by FACS using calibrated beads (Fig 1). We quantified NSCs and their progeny in the SVZ using our recent FACS method combining the LeX NSC marker, an EGF fluorescent ligand and CD24 (Daynac et al, 2013). The populations containing TACs (EGFR^+), immature neuroblasts ($\text{CD24}^+\text{EGFR}^+$) and neuroblasts (CD24^+) were reduced during aging by 75.4%, 84.5% and 65.7%, respectively (Fig1 D-F). By contrast, the populations containing quiescent and activated NSCs, i.e respectively $\text{LeX}^{\text{bright}}$ and $\text{LeX}^+\text{EGFR}^+$, were not significantly altered during aging (Fig1. B, C). Then, the DNA content of these different populations was determined using staining with Hoechst 33342, that is an accurate method to estimate proliferation ($\text{DNA} > 2N$) in the SVZ (Mouthon et al, 2006). Accordingly to their quiescence status, $\text{LeX}^{\text{bright}}$ NSCs have hardly a DNA content $> 2N$ and this was not altered during aging (Fig. 1G). On the other hand, the proportion of cells with a DNA content $> 2N$ was profoundly decreased between 2 and 12 months in activated NSCs whereas it was altered to a lesser extend in TACs and neuroblast during aging (Fig 1I-K). These data suggested that a proliferation defect was mostly observed in activated NSCs.

Our results illustrate that the pools of NSCs remain constant during aging but show a profound proliferation deficit whereas the number of TACs and neuroblasts are altered but presented a lower proliferation deficit. These data support the hypothesis along with activated NSCs acquire a proliferation defect that progressively leads to the subsequent diminution of their progeny in the SVZ.

NSCs and TACs maintain their phenotype and do not enter senescence

One might speculate that proliferation defects observed in activated NSCs are due to cell cycle exit associated to senescence and/or differentiation. The expression of EGFR and Mash1, markers characteristic of activated NSCs and TACs which are lost during

differentiation, was examined on activated NSCs and TACs cells just after sorting, i.e. *ex vivo*. These genes have an expression level that remained unaltered in activated NSCs and TACs obtained from middle-aged as compared to young mice (Fig S1) suggesting that they were not engaged into differentiation process. Of note, NSCs and TACs were sorted for the absence of CD24, a marker that appears during differentiation into neuroblast (Rietze et al, 2001), supporting that they were not differentiated.

Then, we have examined the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors of the INK4 family, i.e. p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} and p19^{INK4d}, previously being associated with brain aging in old mice (2 years) (Molofsky et al, 2005; Molofsky et al, 2006). These genes are expressed at low levels in activated NSC and TACs cells, p16Ink4a being almost undetectable. Moreover, we did not observe any modifications during aging of the expression of these genes in activated NSCs and TACs (Fig S1).

Our data ruled out the possibility that proliferation defects of activated NSCs in middle-aged mice might be due to senescence or to differentiation.

Aging lengthens G1 phase of activated NSCs

Thus, we used time laps video-microscopy to demonstrate that the proliferation defect in activated NSCs was associated to a failure in cell cycle progression. Sorted populations of activated NSCs (LeX⁺EGFR⁺) and TACs (EGFR⁺) were able to proliferate and generate colonies *in vitro* in the presence, or the absence, of added growth factors whereas quiescent LeX^{bright} NSCs do not proliferate *in vitro* (Daynac et al, 2013). Here, sorted activated NSCs and TACs were cultured on poly-D-lysine substrate in the presence of EGF and FGF2 that markedly enhance symmetric cell division and maintained NSCs in an undifferentiated state for several divisions (Costa et al, 2011).

Assuming that it would be unreliable to follow the first division completely, the cell cycle length was determined from the second division and for cells that undergone at least another subsequent division to exclude any alteration due to cell cycle exit. TACs had a cell cycle length of 12.1 ± 1.8 h for young mice (Fig. 2C), which is consistent with the 12h cell cycle length measured *in vivo* (Morshead et al, 1994) and with the 12.5h in the presence EGF and FGF2 *in vitro* (Costa et al, 2011). The cell cycle length of TACs was not altered during aging (Fig. 2C). Similar results were obtained for the third divisions (Fig. 2D). By contrast, the division of activated NSCs was lengthened during aging being of 16.2 ± 3.4 h for middle-aged mice in comparison to 12.3 ± 1.8 h in young mice (Fig. 2A). A comparable slow-down of the cell cycle was observed for the third NSC division (Fig. 2B).

Cultures were followed until the fourth day and the colony size that is an estimate of the number of generated cells was measured. As expected from a similar cell cycle length, young activated NSCs and young TACs generated colonies with a similar size (Fig. 2E-F). However, colonies initiated by activated NSCs from middle-aged mice had a smaller size in comparison to those initiated by young mice (Fig. 2E) highlighting that aged NSCs gave rise to a smaller progeny. This was also in accordance with the prolonged time required for $\text{LeX}^+\text{EGFR}^+$ cells from middle-aged mice to divide. The size of colonies initiated by TACs was similar to that obtained in young mice (Fig. 2F) confirming the absence of proliferation defect in TACs.

To explore more in depth the cell cycle progression, we used FUCCI mice in which cells are red during G1 phase and colorless for the rest of the cell cycle due to the oscillating levels of a red-Cdt1 reporter (Sakaue-Sawano et al, 2008). In addition, cells entering differentiation were reported to be bright for red fluorescence as a consequence of accumulation of the FUCCI red Cdt1 reporter (Roccio et al, 2013). Estimations of FUCCI bright cells two days after plating did not evidence any alterations during aging (Fig S2), confirming that the differentiation of activated NSCs could not be responsible for their proliferation defects in aged mice.

Then, we measured the length of G1 phase using FUCCI red fluorescence for cells that completed a full division and undergone at least another subsequent division to exclude any alteration due to differentiation. The length of G1 phase in TACs was of $4.5 \pm 0.2\text{h}$ but was not altered in middle-aged mice compared to young adults while the length of the rest of the cell cycle, i.e. S/G2/M phases ($7.9 \pm 0.2\text{h}$), was only slightly lengthened during aging ($+0.7\text{h}$) (Fig.3 A,D,E). Interestingly, the lengths of G1 and of S/G2/M phases were similar in young NSCs as compared to TACs as expected since these populations are closely related (Fig. 3). The length of S/G2/M phases was not altered in activated NSCs during aging (Fig. 3C). By contrast, the G1 phase was dramatically lengthened in NSCs obtained from old mice rising from $4.5 \pm 0.2\text{h}$ to $11.0 \pm 0.5\text{h}$ in young and middle-aged mice, respectively (Fig. 3B).

Therefore, our data demonstrate that the cell cycle lengthening of activated NSCs during aging concerns essentially the G1 phase and directly impacts on neurogenesis.

TGF- β controls the G1 length in NSCs from middle-aged mice

We have recently demonstrated that elevation in TGF β signaling in NSC niches inhibits neurogenesis during aging and that anti-TGF β therapy stimulates proliferation of NSCs (Daynac et al, 2013). Moreover, addition of TGF β 1 *in vitro* to total SVZ cells reduced the size of neurospheres but did not alter the number of initiated colonies strongly arguing that it reduces cell cycle progression and had no effect on apoptosis and/or differentiation (Daynac

et al, 2013). Therefore, it appears logical to hypothesize that TGF β could be involved in G1 lengthening in NSCs. In addition, both NSCs and TACs express TGFBR1 and TGFBR2 units, forming the TGF β receptor, but NSCs presented a more pronounced binding for TGF β 1 than TACs (Pineda et al, 2013). Thus, the effects of TGF β 1 addition were examined on sorted NSCs and TACs obtained from young mice. We observed that addition of TGF- β 1 *in vitro* lengthened the G1 phase in both NSCs and TACs in young mice while it did not alter S/G2/M phase length (Fig. 4A, B). Of note, the increase in G1 length was not merely due to differentiation as cell cycle length was analyzed only in cells undergoing a subsequent division.

Two different approaches were used to block TGF β signaling in middle-aged FUCCI red mice: (i) Administration of an anti-TGF β neutralizing antibody; (ii) addition of SB-505124, a selective inhibitor of TGFBR1. These treatments have proven to stimulate efficiently proliferation of NSCs and neurogenesis in aged mice (Daynac et al, 2013).

SB-505124 was added to the culture after sorting and it specifically shortened G1 phase of NSCs from middle-aged mice while it had no effect on S/G2/M phases (Fig. 4C). Moreover, SB-505124 had no effect on TACs albeit a small increase in S/G2/M length was observed (Fig. 4D).

Blockade of TGF β signaling was also achieved by *in vivo* administration of anti-TGF β neutralizing antibody 12h and 1h before sacrifice of the mice and cell sorting. Interestingly, the shortening of the G1 length was observed in middle-aged NSCs by anti-TGF β antibody (Fig. 4C). Obviously, no effects were observed on TACs (Fig. 4D).

Altogether, our data demonstrate that TGF β signaling is accountable for the G1 lengthening in middle-aged NSCs that it is mediated by the release of TGF β in NSCs niches and this mechanism leads to the lessening in neurogenesis during aging.

TGF- β does not increase cyclin-dependent kinase in NSCs

Cyclin-dependent kinase inhibitors of the Kip/Cip family, i.e. p21^{waf}, p27^{Kip1} and p57^{Kip2} are involved in G1 phase regulation of neural stem/progenitor cells (Kawaguchi et al, 2013; Kippin et al, 2005) and might be upregulated by TGF β as previously reported in hematopoietic stem cells (Scandura et al, 2004). However, expression by qPCR revealed that these genes were not altered in NSCs and TACs obtained from middle-aged mice (Fig. S1). These results supposes a TGF β controlled G1 lengthening independent from cdk cell cycle regulators.

Discussion

We point out in this study that one of the leading events involved in the drop of neurogenesis and of neural progenitor proliferation during aging occurs at the stem cell level and is related to the alteration of cell cycle machinery in NSCs. The G₁ phase of the cell cycle is specifically prolonged in activated NSCs during aging and this can be overcome through the blockade of TGF β signaling. Moreover, we have uncovered a potential mechanism by which TGF β opposes EGFR signaling in NSCs.

NSCs have proliferation defects but their stocks are not altered in middle aged mice

We have used our recently published FACS strategy (Daynac et al, 2013) to estimate the pools of the different neural progenitors in young and middle-aged mice along with their proliferation status. The estimate for the entire SVZ show that the absolute levels of TACs and neuroblasts was decreased by more than 66% in middle-aged mice and their proliferation status was alleviated by 20%. Taken that they represent the majority of proliferating SVZ cells, their reduction is in agreement with the decreased proliferation in vivo in the SVZ and the reduced initiation of neurospheres in vitro reaching approximately 50% at 10-12 months (Blackmore et al, 2009; Bouab et al, 2011; Garcia-Moreno et al, 2007) and even more in elderly mice (22-26 months) (Ahlenius et al, 2009; Blackmore et al, 2009; Enwere et al, 2004; Fan et al, 2003; Garcia-Moreno et al, 2007; Maslov et al, 2004; Shook et al, 2012; Tropepe et al, 1997). Using our FACS strategy, we estimated 616 ± 49 LeX+EGFR⁺ cells, or activated NSCs, in the SVZ of 2-month-old mice which is in the same order of magnitude than 533 ± 17 of activated type B1 cells estimated by cumulative BrdU incorporation in GFP::GFAP-positive cells (Ponti et al, 2013). During aging, the amount of activated NSCs was not altered while in vivo proliferation (DNA>2N) of activated NSCs was decreased by 91%. The level of LeX^{bright} cells containing quiescent NSCs was also unaltered during aging. The proliferation defect of activated NSCs underscores that determination of NSCs through the long-term label retaining of thymidine analogs will most probably give imprecise estimation of NSCs and our FACS strategy would be more reliable.

On a cytoarchitectural basis, Shook et al. reported on the dramatic decline in the number of ventricle-contacting NSCs, resulting in a loss of pinwheel structures already in middle-aged mice (Shook et al, 2012). However, there is no demonstration to date that all ventricle-contacting GFAP-positive cells contained in a pinwheel is a functional NSC. On the other

hand, using neurosphere cultures, some studies have reported on the maintenance of NSC capacity with aging while other reported on the decrease (Blackmore et al, 2009; Bouab et al, 2011; Tropepe et al, 1997). In fact, Ahlenius et al. have shown that the reduction in neurosphere forming capacity in aged mice was overcome when SVZ cells were sorted to enrich them in nestin-expressing NSCs (Ahlenius et al, 2009). These results sounded well with our previous study showing that NSCs are still present in the aged brain but the presence of cells from the aged microenvironment, along with secreted inhibitory factor(s), impacts on NSC proliferation and neurogenesis (Daynac et al, 2013).

Our FACS strategy performed on freshly dissociated SVZ cells strongly suggests that the NSC stock remains constant in middle-aged mice while activated NSCs entered a quiescent state as suggested previously (Bouab et al, 2011; Daynac et al, 2013). Moreover, this deficit of NSC proliferation is not associated with differentiation and/or senescence programs but is reversible. Indeed, physical exercise stimulates the recovery of NSC-derived neurospheres in the SVZ of 12-month-old mice to a level similar to juvenile mice strongly arguing that endogenous NSCs persist in middle-aged mice (Blackmore et al, 2009). Moreover, several studies reported on the stimulation of proliferation of endogenous NSCs in the SVZ from middle-aged mice and even from elderly mice by using various pharmacological compounds (Ahlenius et al, 2009; Daynac et al, 2013) (Fan et al, 2003) (L'Episcopo et al, 2013) (van den Berge et al, 2010).

Therefore, the decline in neurogenesis associated with aging of the SVZ niche is due to an alteration of proliferation of the activated NSCs rather than an effect on their stocks.

G1 lengthening in NSCs leads to neurogenesis decline with aging

Elucidating cell cycle kinetics of neural progenitors is a key step to understand the mechanisms underlying the regulation of adult neurogenesis. There have been few studies that have characterized cell cycle length for the different SVZ populations in adult mouse SVZ either in vivo through incorporation of thymidine analogs (Ponti et al, 2013) or in vitro (Costa et al, 2011). The cell cycle length for fast-dividing astroglia NSCs is of 17.2 ± 0.6 hours in vitro in the absence of growth factor (Costa et al, 2011) and it corresponds to that found in vivo (Ponti et al, 2013). The presence of EGF and FGF2 accelerates the cell cycle progression and also markedly enhances symmetric division maintaining NSCs in an undifferentiated state for several divisions (Costa et al, 2011). The present study found that the length of the cell cycle in the presence of EGF and FGF2 for activated NSCs is 12.3 h which is close to the 12.5 h estimated by Costa et al. (Costa et al, 2011) and it is slightly shorter 11.7 h for TACs.

Tropepe et al. have suggested the lengthening of the cell cycle with aging in the SVZ (Tropepe et al, 1997). Our ex vivo technique allow to distinguish the effects of aging on NSCs versus TACs and points out that cell cycle is specifically lengthened in activated NSCs from middle-aged mice but not altered in TACs. Consistent with this the percentage of cells with DNA>2N, i.e. S/G2/M cells, is reduced in the activated NSCs from old mice supporting the lengthening of G1 phase whereas it is only slightly alleviated in TACs.

It is noteworthy that the use of FUCCI mice (Sakaue-Sawano et al, 2008) in our study allowed for the first time to measure the G1 phase length in living NSCs and TACs. This method demonstrates that the G1 phase is specifically lengthened in activated NSCs but not in TACs. In agreement with this observation, Hes1 and cyclin D1, two G1-specific markers (Baek et al, 2006; Momota et al, 2005) were increased in aged NSCs.

Accumulating evidences associate the lengthening of the G1 phase with the commitment of neural progenitors into differentiation (reviewed in (Salomoni & Calegari, 2010)). However, in our study NSCs appeared to not differentiate and, in addition, divisions were analyzed for cell undergoing subsequent divisions to ascertain that they did not exit the cell cycle. Importantly, this G1 lengthening was directly correlated with a lower number of progeny in vitro as evidenced by smaller clones. Contrariwise, the shortening of the G1 phase has been reported to be associated with the expansion of neuronal progenitors after stroke (Zhang et al, 2006). Therefore, the G1 lengthening and the decrease in proliferating activated NSCs might be related to the increase of the so called “relative quiescent” NSCs (Morshead et al, 1994) rather than a true cell cycle exit. Of note, G1 is the phase that is influenced by various cues from the microenvironment and might impact directly on neurogenesis in different pathophysiologic states such aging or stress.

TGFβ opposes EGFR signaling in NSCs

We recently reported a novel mechanism of neurogenesis decline during aging that perturbs the vascular niche via the upregulation of TGF-β (Pineda et al, 2013). Using two different approaches to block TGFβ signaling we were able to restore neurogenesis and induces NSC proliferation (Pineda et al, 2013). Thus, it was likely that persistent TGFβ expression prolongs the G1 phase, thereby reducing cell proliferation. Here, we applied these anti-TGFβ approaches and demonstrated that TGFβ specifically lengthens the G1 in activated NSCs but not in TACs. The observation that only activated proliferation NSCs potential is affected is of major importance in sight of the therapeutic potential. Nonetheless, the addition of TGFβ in vitro slows the G1 phase for both NSCs and TACs, and both of them expressed TGFβ

receptors. Therefore, the NSC specificity might be explained because in the ultrastructural organization of the SVZ NSC niche, NSCs contact blood vessels at sites devoid of pericytes (Tavazoie et al, 2008) and have access to the increased TGF- β 1 production by endothelial cells with aging (Pineda et al, 2013). This hypothesis is strengthened by the fact that in vivo intravenous administration of anti-TGF β restored a normal G1 length in activated NSCs.

Of note, this TGF β -dependent lengthening of G1 appeared to not involve the typical increase in cyclin-dependent kinase inhibitor from the Cip/Kip family, i.e. p21, p27 and p57.

Previous findings support the contention that expansion of the constitutively proliferating population of the SVZ is significantly compromised in the aged forebrain, likely as a result of reduced EGFR signaling, whereas the intrinsic regenerative capacity of the SVZ is unchanged (Enwere et al, 2004; Tropepe et al, 1997). Our data suggest that the expression level of EGFR seems are not altered during aging in activated NSCs as well as TACs. Biochemical analysis of neural progenitors-derived neurospheres from 2- and 12-month-old mice revealed differences in the basal activation states of the Akt and Erk signaling pathways (Bouab et al, 2011). The Akt and Erk pathways are downstream of several growth factor receptors, including EGFR, and are considered important mediators of NSC survival, proliferation and differentiation signals. Furthermore, intracerebro-ventricular injection of heparin binding EGF (HB-EGF), as well as FGF-2, in old mice (23-25 months) allows recovering proliferation levels of young adult mice (Jin et al, 2003) suggesting that defect in EGFR signaling is a main event leading to diminution of proliferation observed with aging.

Interestingly, culture of neural progenitors from human SVZ has been initiated even in old patients (Leonard et al, 2009), thus it might be advantageous to control of cell cycle in order to improve the recovery in old patients.

Our data highlight the importance of NSC cell-cycle regulation and provide an attractive basis for the development of regenerative therapies based on stimulating endogenous neurogenesis.

Materials and methods

Animals and irradiation procedure

Young adult (2 months) and middle-aged (12 months) C57Bl/6 mice were used in this study. The animals were maintained with access to food and water *ad libitum* in a colony room kept at a constant temperature (19°C-22°C) and humidity (40-50%) on a 12:12 h light/dark cycle. For cell cycle analysis, transgenic Fluorescence Ubiquitination Cell Cycle Indicator (FUCCI) red mice were used (Sakaue-Sawano et al, 2008). Animal experiments were performed in compliance with the European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC) and were approved by our institution's ethics committee.

Drug administration

In vivo treatment involved i.v administration of an antibody that neutralizes all TGF β -1, -2, -3 forms (mAb1835, R&D) to sacrifice. Fifty micrograms/injection/mice of anti-TGF β neutralizing antibody diluted in 50 μ l of NaCl 0.9% were administered retro-orbitally 12h and 1h before sacrifice. For *in vitro* treatment, freshly plated cells were treated with a selective T β RI inhibitor, SB-505124 (1 μ M, Sigma) as previously described (Pineda et al, 2013).

Preparation of Cells and FACS

Lateral ventricle walls containing cells from the SVZ were microdissected under a binocular dissection microscope and collected in a cold 0.6% glucose/PBS solution. SVZ cells were incubated at 37°C with papain and then dissociated into single-cell suspensions by flushing the cells through a p200 micropipette tip, as previously described (Daynac et al, 2013). For DNA content analysis, dissociated cells were incubated for 1 h 30 min at 37°C with 5 μ g/mL Hoechst 33342 (Sigma) in DMEM:F12 medium supplemented with 2% B27 (Mouthon et al, 2006). Then, the cells were washed in PBS containing 0.15% bovine serum albumin. For mouse cell-surface marker analysis, we used CD24 phycoerythrin [PE]-conjugated (rat IgG2b; 1:50 BD Biosciences), CD15/LeX fluorescein isothiocyanate [FITC]-conjugated (mouse IgM; 1:50 BD Biosciences), Alexa647-conjugated EGF ligand (1:200, Life Technologies). Antibodies were titrated over a semi-log scale to determine the appropriate dilution in the PBS/0.15% bovine albumin serum solution and then incubated at 4°C for 25 min. The cells were washed prior to sorting or analysis. For determining absolute counts of cells, we used Trucount tubes (BD Biosciences) where each tube contains a calibrated number

of fluorescent beads, allowing acute counting of cells in the tube. Immediately prior to FACS, propidium iodide (PI) or Hoechst 33258 was added to a final concentration of 2 $\mu\text{g/mL}$ to label dead cells. The cells were analyzed on a LSRII (BD Biosciences) and sorted on an INFLUX (BD Biosciences). Sorting gates were drawn according to fluorescence minus one (FMO) controls. The data were analyzed using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

Live Cell Imaging

Freshly sorted cells were plated at a density of $1\text{-}3 \times 10^3$ cells/well in poly-D-Lysine- (Sigma) coated 24-well glass bottom culture plates (MatTek Corp., Ashland, MA). The culture medium was composed of NeuroCult medium (STEMCELL Technologies) complemented with proliferation supplements (STEMCELL Technologies), 2 $\mu\text{g/mL}$ heparin, 20 ng/mL EGF and 10 ng/mL FGF-2. Brightfield and fluorescent images for Cdt1-red were captured through a Plan Apo VC 20x DIC objective (NA: 0.75) on a Nikon A1R confocal laser scanning microscope system attached to an inverted ECLIPSE Ti (Nikon Corp., Tokyo, Japan) thermostated at 37°C under 5% of CO₂ atmosphere. FUCCI Red fluorescence was excited at 561nm and collected using a 595/50nm filter set. Images were acquired using high speed resonant scanner at 512x512 pixels format with a resolution equals to 1.26 μm /pixel in xy. A square region of 7 x 7 mm² was photographed for each well. Live imaging started 20 h after plating. Single cell tracking was performed over periods of up to 24h with images taken at 20 minute intervals in order to follow the fate of individual cells and their progeny. To allow the measurement of the whole cell cycle, analysis started at the end of the first division. Then, cell cycle length was determined for cells undergoing subsequent division to avoid any alteration due to differentiation. Images and time-lapse video were analyzed with ImageJ and NIS-Elements AR.13.00 64-bit softwares.

RNA isolation and qRT-PCR

After sorting, cells were immediately lysed in RLT buffer (QIAGEN). Total RNA was isolated with the RNeasy MICRO kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions. Q-PCR was performed on an ABI PRISM 7200 Sequence Detector System using SYBR Green for RT-PCR. cDNA was synthesized using the Reverse Transcription High Capacity Master Mix (Applied Biosystems) with specific primers (Eurogentec). Expression levels were normalized to GAPDH.

Statistical analyses

Non-parametric tests were conducted using StatView5 software (SAS Institute Inc., Cary, NC); the Kruskal-Wallis test was used for multiple comparisons, and the Mann-Whitney test was used for two comparisons. The statistical significance was set at $P < 0.05$. The data are expressed as the mean \pm SEM.

References

- Ahlenius H, Visan V, Kokaia M, Lindvall O, Kokaia Z (2009) Neural stem and progenitor cells retain their potential for proliferation and differentiation into functional neurons despite lower number in aged brain. *J Neurosci* **29**: 4408-4419
- Alonso M, Viollet C, Gabellec MM, Meas-Yedid V, Olivo-Marin JC, Lledo PM (2006) Olfactory discrimination learning increases the survival of adult-born neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci* **26**: 10508-10513
- Baek KH, Park HY, Kang CM, Kim SJ, Jeong SJ, Hong EK, Park JW, Sung YC, Suzuki T, Kim CM, Lee CW (2006) Overexpression of hepatitis C virus NS5A protein induces chromosome instability via mitotic cell cycle dysregulation. *Journal of molecular biology* **359**: 22-34
- Balordi F, Fishell G (2007) Hedgehog signaling in the subventricular zone is required for both the maintenance of stem cells and the migration of newborn neurons. *J Neurosci* **27**: 5936-5947
- Blackmore DG, Golmohammadi MG, Large B, Waters MJ, Rietze RL (2009) Exercise increases neural stem cell number in a growth hormone-dependent manner, augmenting the regenerative response in aged mice. *Stem Cells* **27**: 2044-2052
- Bouab M, Paliouras GN, Aumont A, Forest-Berard K, Fernandes KJ (2011) Aging of the subventricular zone neural stem cell niche: evidence for quiescence-associated changes between early and mid-adulthood. *Neuroscience* **173**: 135-149
- Cimadamore F, Fishwick K, Giusto E, Gnedeva K, Cattarossi G, Miller A, Pluchino S, Brill LM, Bronner-Fraser M, Terskikh AV (2011) Human ESC-derived neural crest model reveals a key role for SOX2 in sensory neurogenesis. *Cell Stem Cell* **8**: 538-551
- Costa MR, Ortega F, Brill MS, Beckervordersandforth R, Petrone C, Schroeder T, Gotz M, Berninger B (2011) Continuous live imaging of adult neural stem cell division and lineage progression in vitro. *Development* **138**: 1057-1068
- Daynac M, Chicheportiche A, Pineda JR, Gauthier LR, Boussin FD, Mouchon MA (2013) Quiescent neural stem cells exit dormancy upon alteration of GABAR signaling following radiation damage. *Stem cell research* **11**: 516-528
- Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* **97**: 703-716
- Doetsch F, Petreanu L, Caille I, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2002) EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* **36**: 1021-1034
- Enwere E, Shingo T, Gregg C, Fujikawa H, Ohta S, Weiss S (2004) Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signaling, diminished olfactory neurogenesis, and deficits in fine olfactory discrimination. *J Neurosci* **24**: 8354-8365

Fan XT, Cai WQ, Yang Z, Xu HW, Zhang JH (2003) Effect of antisense oligonucleotide of noggin on spatial learning and memory of rats. *Acta pharmacologica Sinica* **24**: 394-397

Garcia-Moreno F, Lopez-Mascaraque L, De Carlos JA (2007) Origins and migratory routes of murine Cajal-Retzius cells. *J Comp Neurol* **500**: 419-432

Hamilton LK, Joppe SE, L MC, Fernandes KJ (2013) Aging and neurogenesis in the adult forebrain: what we have learned and where we should go from here. *Eur J Neurosci* **37**: 1978-1986

Jin K, Sun Y, Xie L, Batteur S, Mao XO, Smelick C, Logvinova A, Greenberg DA (2003) Neurogenesis and aging: FGF-2 and HB-EGF restore neurogenesis in hippocampus and subventricular zone of aged mice. *Aging Cell* **2**: 175-183

Kawaguchi D, Furutachi S, Kawai H, Hozumi K, Gotoh Y (2013) Dll1 maintains quiescence of adult neural stem cells and segregates asymmetrically during mitosis. *Nature communications* **4**: 1880

Kippin TE, Martens DJ, van der Kooy D (2005) p21 loss compromises the relative quiescence of forebrain stem cell proliferation leading to exhaustion of their proliferation capacity. *Genes Dev* **19**: 756-767

Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* **16**: 2027-2033

L'Episcopo F, Tirolo C, Testa N, Caniglia S, Morale MC, Impagnatiello F, Pluchino S, Marchetti B (2013) Aging-induced Nrf2-ARE pathway disruption in the subventricular zone drives neurogenic impairment in parkinsonian mice via PI3K-Wnt/beta-catenin dysregulation. *J Neurosci* **33**: 1462-1485

Leonard BW, Mastroeni D, Grover A, Liu Q, Yang K, Gao M, Wu J, Pootrakul D, van den Berge SA, Hol EM, Rogers J (2009) Subventricular zone neural progenitors from rapid brain autopsies of elderly subjects with and without neurodegenerative disease. *J Comp Neurol* **515**: 269-294

Lepousez G, Valley MT, Lledo PM (2013) The impact of adult neurogenesis on olfactory bulb circuits and computations. *Annual review of physiology* **75**: 339-363

Lois C, Alvarez-Buylla A (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* **264**: 1145-1148

Lugert S, Basak O, Knuckles P, Haussler U, Fabel K, Gotz M, Haas CA, Kempermann G, Taylor V, Giachino C (2010) Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging. *Cell Stem Cell* **6**: 445-456

Maslov AY, Barone TA, Plunkett RJ, Pruitt SC (2004) Neural stem cell detection, characterization, and age-related changes in the subventricular zone of mice. *J Neurosci* **24**: 1726-1733

Molofsky AV, He S, Bydon M, Morrison SJ, Pardal R (2005) Bmi-1 promotes neural stem cell self-renewal and neural development but not mouse growth and survival by repressing the p16Ink4a and p19Arf senescence pathways. *Genes Dev* **19**: 1432-1437

Molofsky AV, Slutsky SG, Joseph NM, He S, Pardal R, Krishnamurthy J, Sharpless NE, Morrison SJ (2006) Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature* **443**: 448-452

Momota H, Nerio E, Holland EC (2005) Perifosine inhibits multiple signaling pathways in glial progenitors and cooperates with temozolomide to arrest cell proliferation in gliomas in vivo. *Cancer Res* **65**: 7429-7435

Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA, Morassutti D, Weiss S, van der Kooy D (1994) Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* **13**: 1071-1082

Mouthon MA, Fouchet P, Mathieu C, Sii-Felice K, Etienne O, Lages CS, Boussin FD (2006) Neural stem cells from mouse forebrain are contained in a population distinct from the 'side population'. *J Neurochem* **99**: 807-817

Pastrana E, Cheng LC, Doetsch F (2009) Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 6387-6392

Pineda JR, Daynac M, Chicheportiche A, Cebrian-Silla A, Sii Felice K, Garcia-Verdugo JM, Boussin FD, Mouthon MA (2013) Vascular-derived TGF-beta increases in the stem cell niche and perturbs neurogenesis during aging and following irradiation in the adult mouse brain. *EMBO molecular medicine*

Ponti G, Obernier K, Guinto C, Jose L, Bonfanti L, Alvarez-Buylla A (2013) Cell cycle and lineage progression of neural progenitors in the ventricular-subventricular zones of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: E1045-1054

Rietze RL, Valcanis H, Brooker GF, Thomas T, Voss AK, Bartlett PF (2001) Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain. *Nature* **412**: 736-739

Roccio M, Schmitter D, Knobloch M, Okawa Y, Sage D, Lutolf MP (2013) Predicting stem cell fate changes by differential cell cycle progression patterns. *Development* **140**: 459-470

Sakaue-Sawano A, Kurokawa H, Morimura T, Hanyu A, Hama H, Osawa H, Kashiwagi S, Fukami K, Miyata T, Miyoshi H, Imamura T, Ogawa M, Masai H, Miyawaki A (2008) Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell* **132**: 487-498

Salomoni P, Calegari F (2010) Cell cycle control of mammalian neural stem cells: putting a speed limit on G1. *Trends in cell biology* **20**: 233-243

Scandura JM, Boccuni P, Massague J, Nimer SD (2004) Transforming growth factor beta-induced cell cycle arrest of human hematopoietic cells requires p57KIP2 up-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 15231-15236

Shook BA, Manz DH, Peters JJ, Kang S, Conover JC (2012) Spatiotemporal changes to the subventricular zone stem cell pool through aging. *J Neurosci* **32**: 6947-6956

Sii-Felice K, Etienne O, Hoffschir F, Mathieu C, Riou L, Barroca V, Haton C, Arwert F, Fouchet P, Boussin FD, Mouthon MA (2008) Fanconi DNA repair pathway is required for survival and long-term maintenance of neural progenitors. *EMBO J* **27**: 770-781

Tavazoie M, Van der Veken L, Silva-Vargas V, Louissaint M, Colonna L, Zaidi B, Garcia-Verdugo JM, Doetsch F (2008) A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* **3**: 279-288

Tropepe V, Craig CG, Morshead CM, van der Kooy D (1997) Transforming growth factor-alpha null and senescent mice show decreased neural progenitor cell proliferation in the forebrain subependyma. *J Neurosci* **17**: 7850-7859

van den Berge SA, Middeldorp J, Zhang CE, Curtis MA, Leonard BW, Mastroeni D, Voorn P, van de Berg WD, Huitinga I, Hol EM (2010) Longterm quiescent cells in the aged human subventricular neurogenic system specifically express GFAP-delta. *Aging Cell* **9**: 313-326

Zhang RL, Zhang ZG, Lu M, Wang Y, Yang JJ, Chopp M (2006) Reduction of the cell cycle length by decreasing G1 phase and cell cycle reentry expand neuronal progenitor cells in the subventricular zone of adult rat after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* **26**: 857-863

Figure 1

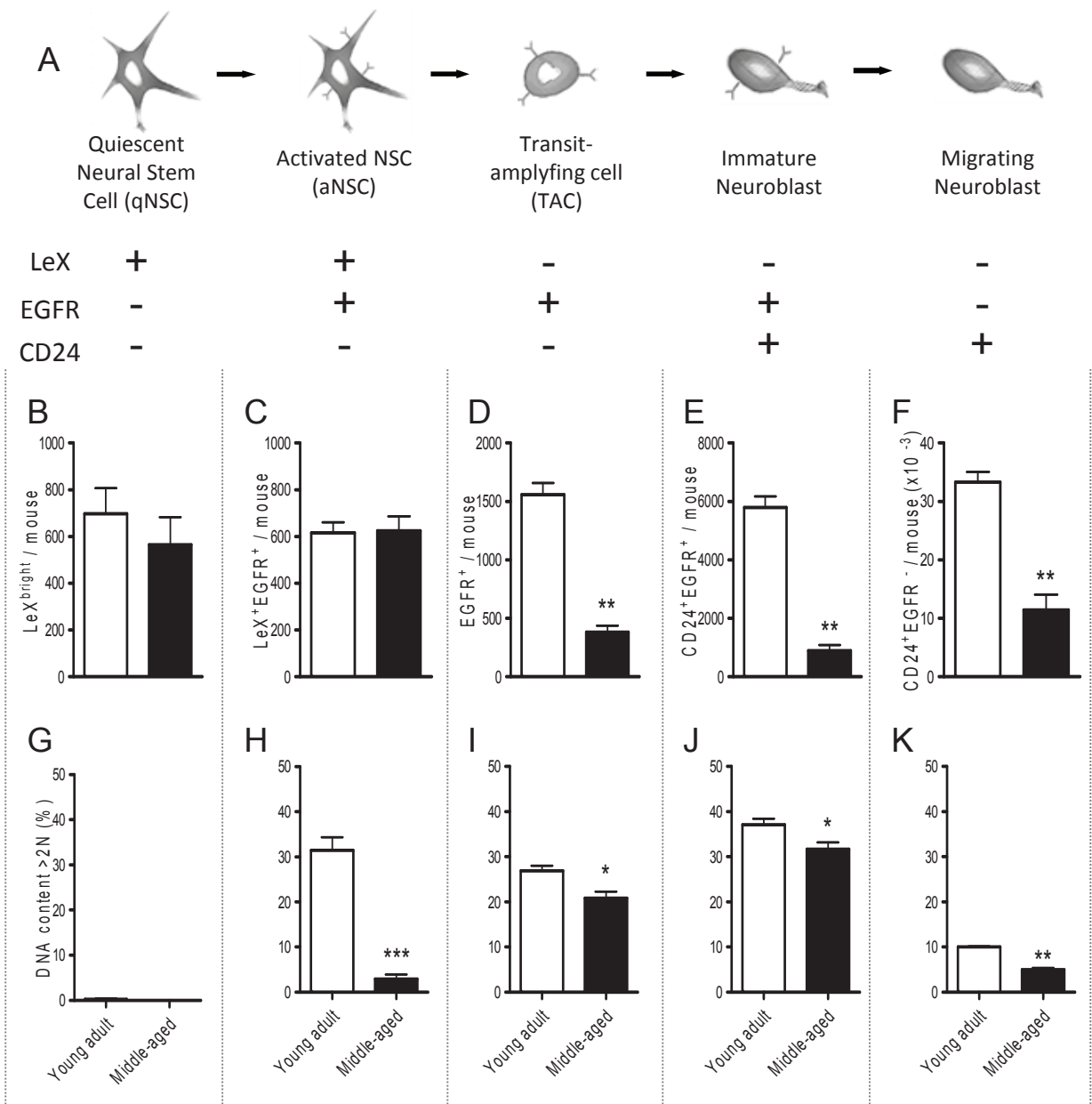


Figure 2

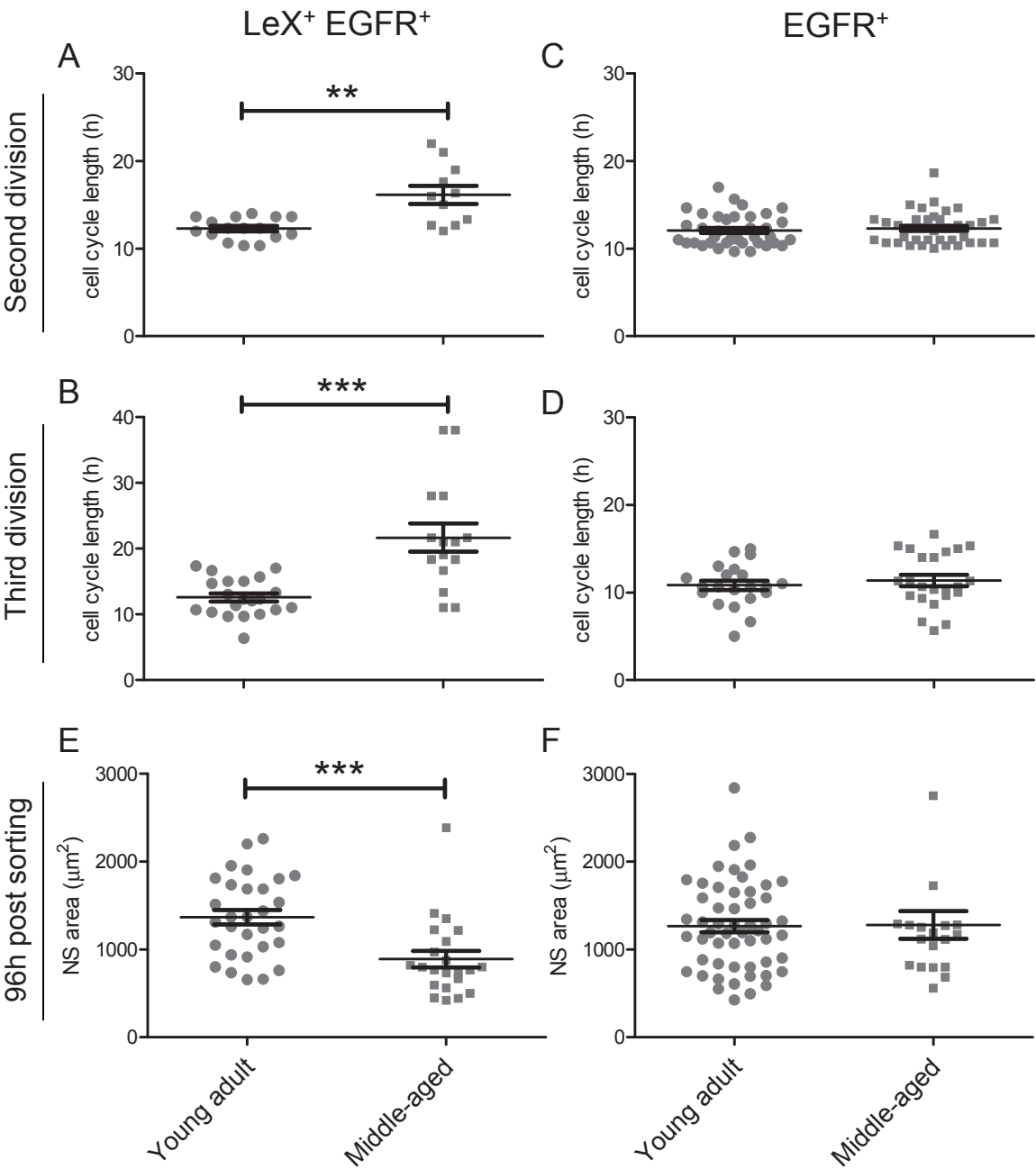


Figure 3

Echelle: 1 pixel = 1,26 μ m,
images de 50x50

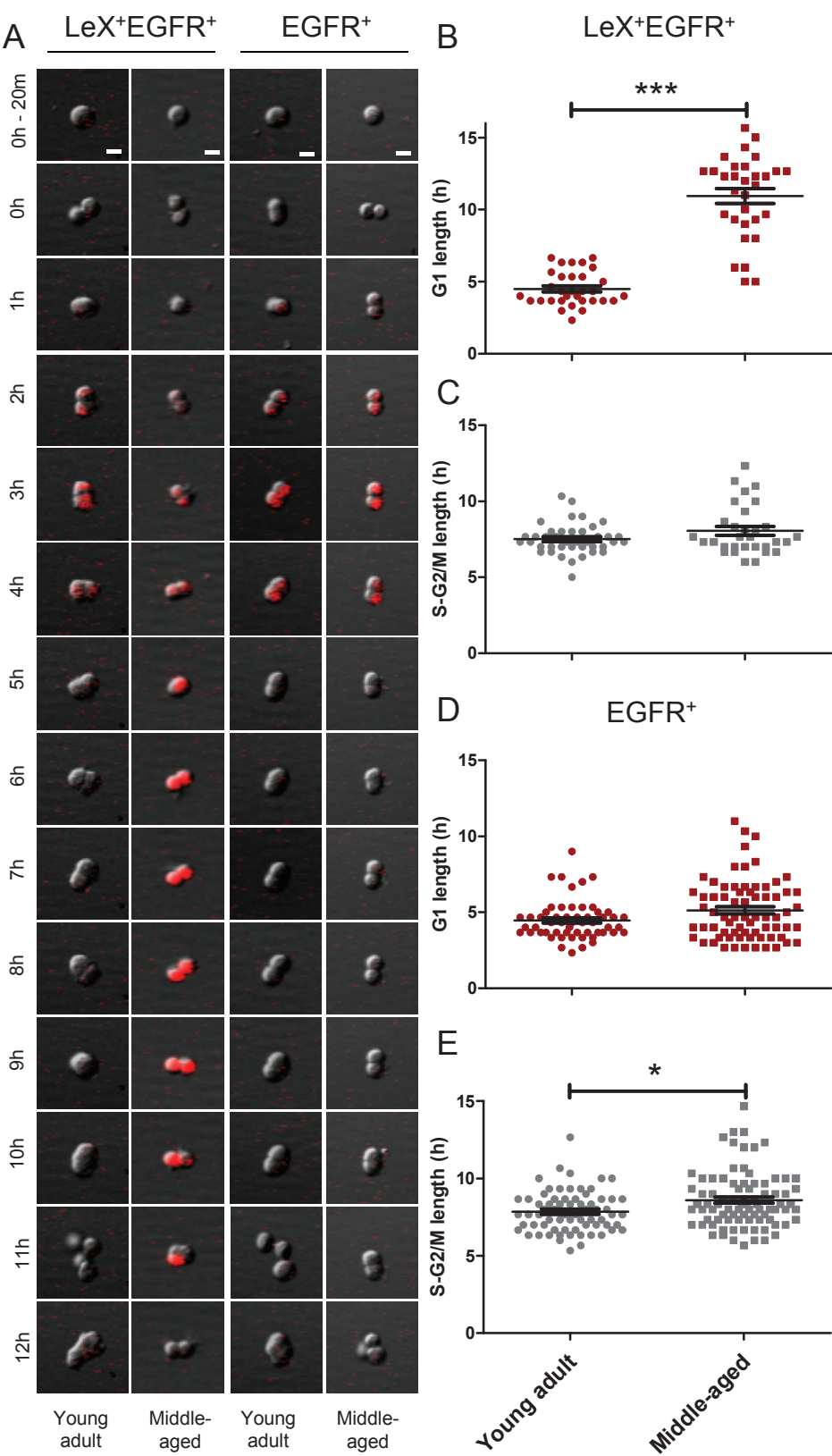


Figure 4

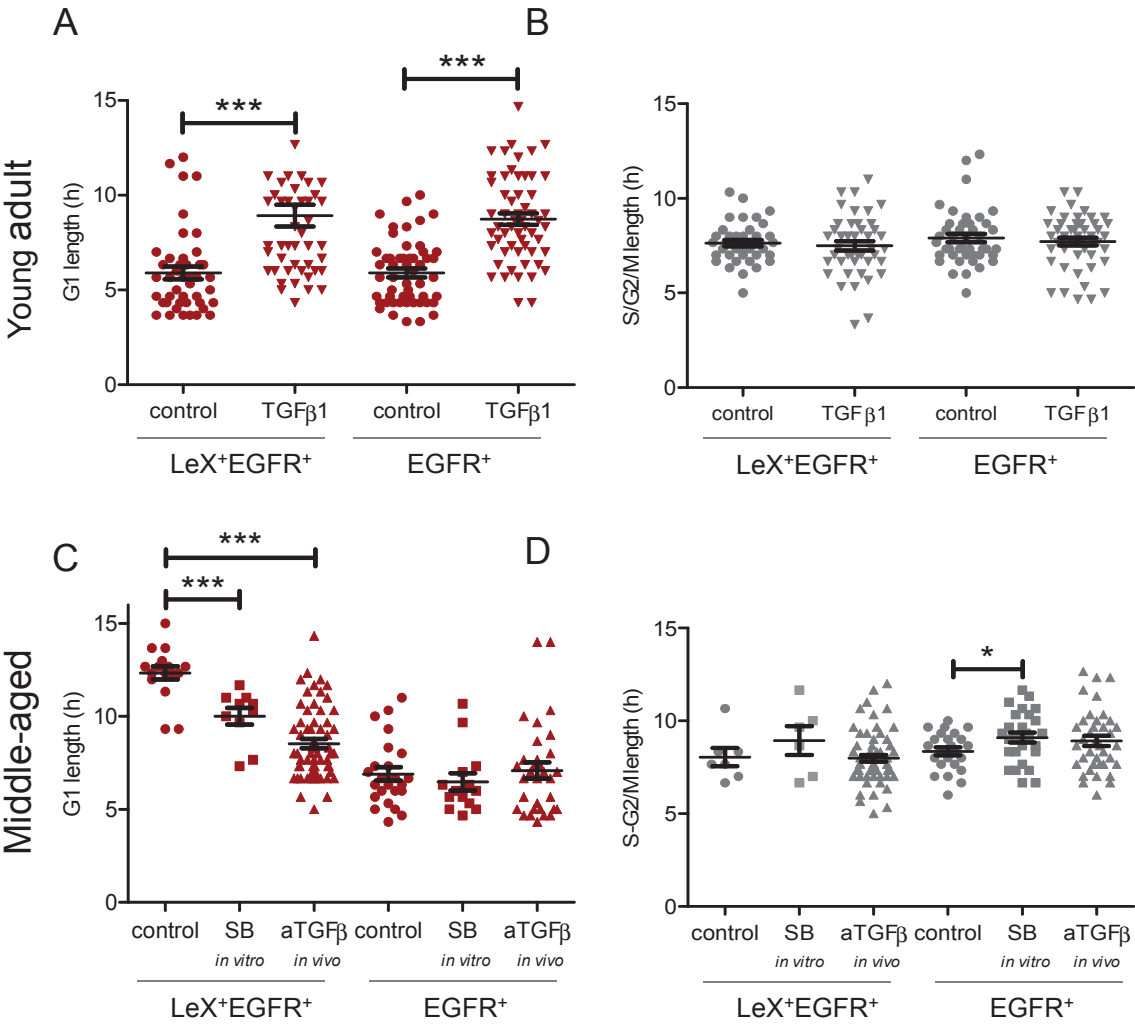


Figure S1

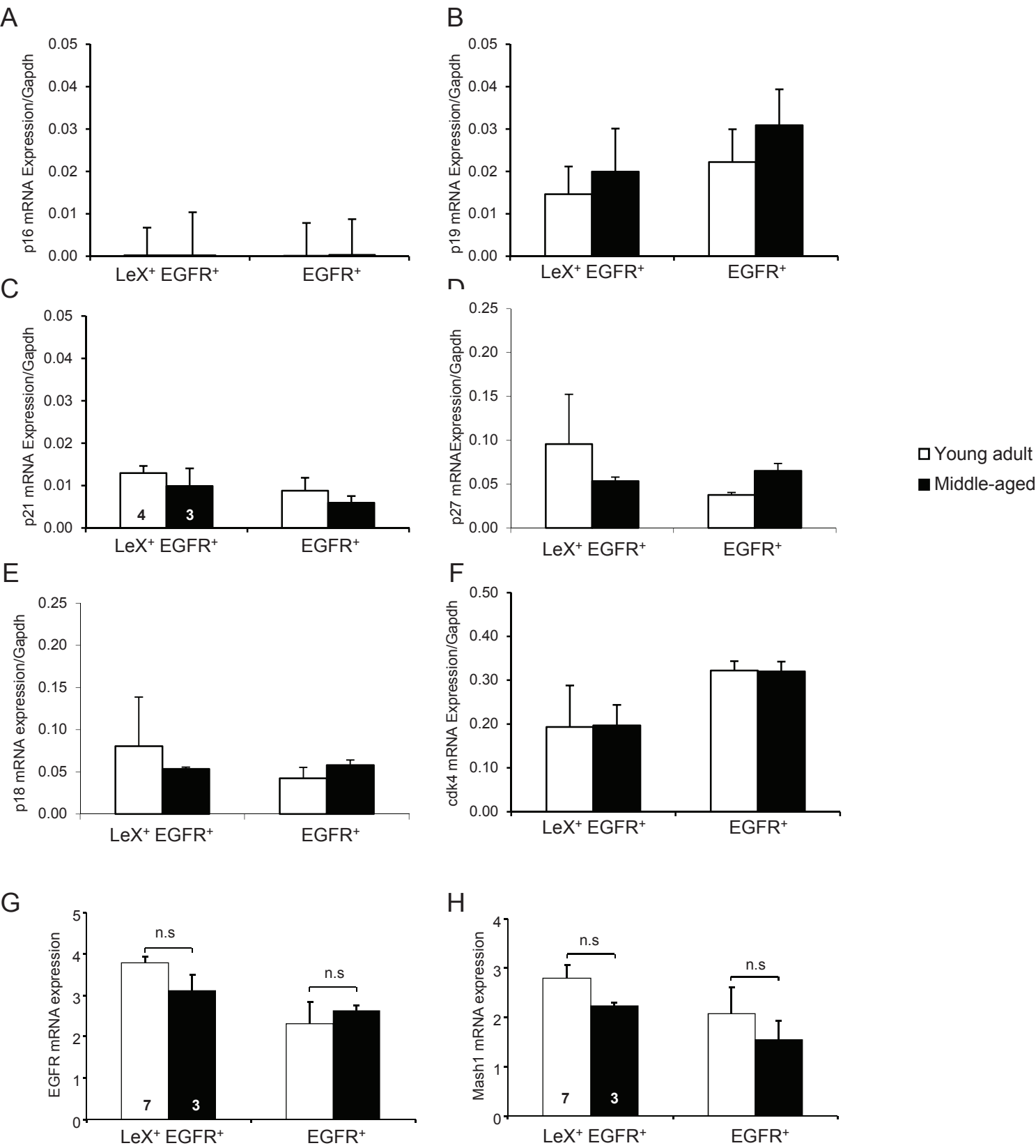


Figure S2

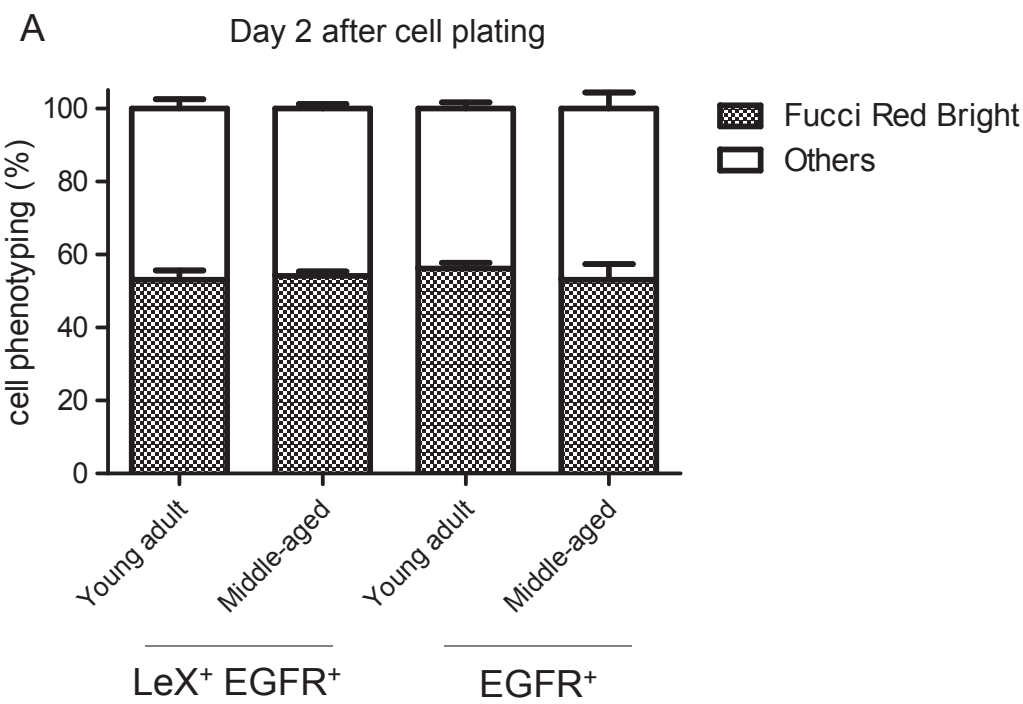


Figure legends

Figure 1: NSCs stock is constant but mainly aNSCs present proliferation defect in mid-aged mice.

(A) Phenotyping of the five main population in the SVZ and the markers used for FACS as previously described (Daynac et al., 2013). (B-F) Evaluation of the total number of each cell type using Trucount tubes (BD Biosciences) for young adult (2 months) and mid aged (12 months) mice. (G-K) Proliferation was determined in the SVZ using the vital marker HO 33342. Data were obtained from 7 and 5 independent experiments for young and mid-aged mice respectively. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 2: Proliferation defect in mid-aged aNSCs is linked to a cell-cycle lengthening

(A-D) Evaluation of total cell-cycle length of LeX⁺EGFR⁺ and EGFR⁺ cells in young and mid-aged mice for their second and third division after plating. (E-F) Neurosphere area determined 96h after plating. Cells analysed from two independent sorts are presented on the graphs. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 3: aNSCs G1 phase is specifically lengthened in mid-aged mice

(A) Images captured from live imaging video-microscopy with FUCCI red mice show a specific lengthening of mid-aged aNSCs after their first division *in vitro*. (B-E) Evaluation of second division G1 and S/G2/M length for LeX⁺EGFR⁺ and EGFR⁺ cells in young and mid-aged mice. Cells analysed from two independent sorts are presented on the graphs. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. Scale bars = 5 μm .

Figure 4: TGF β signalling controls G1 phase length

(A,B) Evaluation of second division G1 and S/G2/M phases for LeX⁺EGFR⁺ and EGFR⁺ cells in young mice with or without TGF β 1 treatment *in vitro*. (A,B) Evaluation of second division G1 and S/G2/M phases for LeX⁺EGFR⁺ and EGFR⁺ cells in mid-aged mice with or without SB-505124 treatment *in vitro* and anti-TGF β neutralizing antibody treatment *in vivo*. Cells analysed from two independent sorts are presented on the graphs. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Figure Sup Legends

Figure S1: No senescence nor differentiation is induced by aging until mid-age

(A-D) mRNA expression of senescence markers (p16, p19) and cell cycle regulators (p21, cdk4) in LeX⁺EGFR⁺ and EGFR⁺ cells from young and mid-aged mice. (E,F) mRNA expression of TACs markers EGFR and mash1) in LeX⁺EGFR⁺ and EGFR⁺ cells from young and mid-aged mice. The number of independent sorts used for analyses is indicated within the bars.

Figure S2: No senescence nor differentiation is induced by aging until mid-age

(A) Counting of the number of cells entering differentiation (Fucci Red Bright cells) two days after plating. Three independent sorts were used for this analysis.

DISCUSSION

1. Purification des CSN de la ZSV par cytométrie en flux

1.1 Difficultés à purifier les CSN des niches neurogéniques

La découverte de la neurogenèse et des cellules souches neurales adultes a ouvert un champ considérable d'applications possibles, notamment comme outil pour la médecine réparatrice du cerveau. Cependant, les progrès dans le domaine sont freinés par une connaissance limitée des mécanismes moléculaires gouvernant les propriétés uniques des CSN, en tant que source de la neurogenèse dans le cerveau adulte. Une meilleure connaissance de ces mécanismes moléculaires nécessite notamment la mise en place de techniques efficaces de purification des CSN et de leurs cellules filles, afin de comparer leurs caractéristiques. Des expériences initiales ont suggéré que les cellules formant des neurosphères *in vitro* s'auto-renouvellent, ont la capacité de se différencier en oligodendrocytes, astrocytes et neurones (Weiss et al., 1996), et sont probablement dérivées des CSN *in vivo* (Morshead et al., 1994). Les CSN engendrant des neurosphères *in vitro* sont une sous population de cellules de type B1 exprimant l'EGFR, baptisées « CSN activées » par opposition aux cellules de type B1 n'exprimant pas l'EGFR et ne donnant pas de neurosphères *in vitro* et baptisées « CSN quiescentes » (Doetsch et al., 2002). Cependant, la capacité à former des neurosphères dans le modèle de Reynolds (Reynolds and Weiss, 1992) n'est pas exclusive aux cellules à caractère souche. En effet, à la fois les cellules de type B1 « activées » et les cellules de type C (qui expriment aussi le récepteur à l'EGF) peuvent former des neurosphères (Doetsch et al., 2002). Les progéniteurs des oligodendrocytes peuvent aussi, sous stimulation par des facteurs de croissance, former des neurosphères pluripotentes (Kondo and Raff, 2000). De plus, les neurosphères se développent en présence de hautes concentrations d'EGF et FGF2, et diffèrent fortement de leurs homologues *in vivo*, de par leur forte prolifération (les CSN *in vivo* prolifèrent lentement), la génération

prédominante de cellules gliales (les CSN *in vivo* forment principalement des neurones), et la dérégulation de certaines voies déterminantes, comme sonic hedgehog (Gabay et al., 2003) (Hack et al., 2005). Plusieurs équipes ont purifié des populations de la ZSV par cytométrie en flux (FACS) et caractérisé les populations enrichies en CSN par leur capacité à produire des neurosphère *in vitro* (Kawaguchi et al., 2001) (Capela and Temple, 2002) (Ciccolini et al., 2005). Ces techniques prometteuses ne permettent pas de distinguer les cellules de type B1 activées des cellules de type C. Une équipe est allée plus loin en distinguant les cellules de type B1 activées des cellules de type C en utilisant des souris transgéniques GFAP ::GFP (Pastrana et al., 2009). Cependant, un de ses principaux défauts est qu'elle ne permet pas de distinguer clairement les CSN « quiescentes » des astrocytes non souche. Plus récemment, une méthode a été mise au point pour purifier les CSN quiescentes grâce à leur caractéristique de cellules ciliées (Beckervordersandforth et al., 2010). Même si l'approche de cette étude est particulièrement intéressante, une seule population neurogénique GFAP(+)-Prominin-1(+) a été isolée et elle ne distingue pas les CSN quiescentes des CSN activées, car elle ne prend pas en compte l'expression de l'EGFR. De plus, le marquage de la prominin-1 sur les CSN est particulièrement difficile à distinguer par FACS étant donné que les CSN n'expriment qu'un seul cil primaire contre plus de 50 cils motiles pour les cellules épendymaires. Il était donc nécessaire de mettre au point une méthode permettant de purifier efficacement les deux types de cellules souches de type B1 (quiescentes et activées), afin de mieux comprendre les voies moléculaires caractéristiques de leur entrée en cycle.

1.2 Stratégie permettant de purifier les CSN quiescentes, les CSN activées ainsi que leurs cellules filles

Nous avons mis en place une méthode simple et efficace pour distinguer et purifier les CSN quiescentes/activées et leurs cellules filles par cytométrie en flux. Cette technique ne nécessite pas l'utilisation de souris transgéniques et permet de distinguer les 5 principales populations neurogéniques peuplant la ZSV. Elle combine l'utilisation du marqueur de CSN LeX, le CD24, l'EGFR ainsi que le marqueur vital d'ADN Hoechst 33342 (Daynac et al., 2013). Nos résultats montrent une corrélation directe entre la prolifération et l'expression de l'EGFR : les cellules activement en

prolifération *in vivo* et donnant des colonies *in vitro* sont contenues dans les populations exprimant l'EGFR. Ces cellules EGFR-positives sont réparties en trois populations cellulaires : les CSN activées, les cellules de type C et les jeunes neuroblastes, en accord avec les données de la littérature (Doetsch et al., 2002) (Pastrana et al., 2009). Nous montrons dans notre modèle que les cellules LeX⁺ expriment les marqueurs de cellules souches GFAP, GLAST et TLX et bordent le ventricule. De plus, nous avons mis en évidence une nouvelle sous-population de cellules LeX^{bright} enrichies en CSN, comme l'atteste leur phénotype majoritairement GFAP⁺Nestin⁺, caractéristique des CSN adultes. En évaluant la répartition dans le cycle des différentes populations par trois approches différentes : contenu en ADN, positivité FUCCI green et expression des ARNm des cyclines, nous prouvons grâce à ce modèle que les CSN activées sont contenues dans la population LeX⁺EGFR⁺ tandis que la population LeX^{bright} est enrichie en CSN quiescentes. C'est la première fois qu'une stratégie de tri par cytométrie en flux permet de distinguer une population enrichie en CSN quiescentes d'une population enrichie en CSN activées. De plus elle permet de purifier les cellules de type C, les jeunes neuroblastes et les neuroblastes matures tout en évaluant leur contenu en ADN. Cette stratégie promet des avancées majeures dans la découverte des mécanismes régulant la quiescence et la prolifération des CSN dans la ZSV. Pour aller plus loin, il serait intéressant de comparer le transcriptome des CSN quiescentes LeX^{bright} et des CSN activées LeX⁺EGFR⁺, afin de découvrir de nouvelles voies potentiellement impliquées dans l'activation des CSN quiescentes. De plus, il pourrait être utile de vérifier si notre méthode de purification peut s'appliquer aux autres régions neurogeniques du cerveau adulte, et notamment la ZSG.

2. Modèle d'irradiation du cerveau à dose modérée

2.1 Régénération de la ZSV après une dose modérée d'irradiation

Les traitements anti-mitotiques, comme la cytosine arabinoside et l'³HTdR permettent d'éliminer les cellules en prolifération, alors que les CSN résistent au traitement et permettent la repopulation de la ZSV (Doetsch et al., 1999b) (Morshead et al., 1994). L'inconvénient d'utiliser des sources isotopiques comme la thymidine tritiée est que la dose est difficile à déterminer *in vivo*. L'irradiation externe du cerveau présente l'avantage de pouvoir facilement faire varier la dose, et de pouvoir ainsi contrôler le type de cellule visé en fonction de la dose et de la radiosensibilité de chaque type cellulaire. A des doses excédant 10Gy, la neurogenèse est bloquée à long terme et on n'observe pas de reprise de la prolifération cellulaire dans la ZSV (Tada et al., 1999). Ces modèles à fortes doses entraînent des dommages trop importants pour que la neurogenèse reparte efficacement, nous avons donc développé un modèle d'irradiation du cerveau adulte à doses modérées (2Gy/4Gy), permettant d'étudier la reconstitution de la ZSV. De façon intéressante, après une irradiation de 4 Gy, chaque population sélectionnée par notre technique de FACS récupère son stock initial dans l'ordre de différenciation, ce qui valide notre méthode de sélection des populations (Daynac et al., 2013). Ainsi, nous proposons une technique d'irradiation du cerveau adulte à dose modérée pour étudier la reprise de la neurogenèse dans la ZSV, qui permet de suivre les différentes phases de différenciation des CSN, jusqu'aux neuroblastes migrant vers les bulbes olfactifs.

2.2 Entrée en cycle des CSN quiescentes après irradiation

Dans notre modèle, la grande majorité des cellules cyclantes, dont les CSN activées et les cellules de type C, meurent rapidement après irradiation par une apoptose p53 dépendante, alors que la majorité des LeX^{bright} survivent (Daynac et al., 2013). Nous avons vérifié que les cellules LeX^{bright} résistent à des fortes doses (15Gy), confirmant de précédentes études où les CSN résistent à des doses de 10Gy, en perdant

toutefois leur capacité à produire de nouveaux neurones (Achanta et al., 2012). Les astrocytes EGFR+ caractérisées comme les cellules de type B1 activées sont sensibles au traitement anti-mitotique AraC, mais réapparaissent 12h après traitement pour permettre la régénération de la ZSV (Pastrana et al., 2009). Toutefois, les étapes d'activation des CSN quiescentes restent méconnues. Dans notre étude, la caractérisation des cellules cyclantes par FACS et les méthodes *in situ* (BrdU, FUCCI green, pRb) montrent que 48h après une irradiation à 4Gy, la majorité des cellules proliférantes ont un phénotype de CSN GFAP+ et LeX^{bright}. De plus, des analyses de traçage au BrdU montrent que les cellules en prolifération 48h après irradiation produisent des neuroblastes migrants vers les bulbes olfactifs et sont donc bien responsables de la reprise de la neurogenèse. Cependant, la majorité des CSN qui prolifèrent 48h après irradiation n'expriment pas l'EGFR. Ainsi, après irradiation, les CSN quiescentes entrent en phase S avant l'acquisition de l'EGFR, montrant que la voie de signalisation de l'EGFR n'est pas nécessaire à l'entrée en S des CSN quiescentes. Nous décrivons pour la première fois une étape d'activation précoce des CSN quiescentes, leur permettant d'entrer en prolifération avant d'exprimer l'EGFR. Il faudrait vérifier que cette étape d'activation précoce n'est pas caractéristique d'une réponse à l'irradiation et existe aussi *in vivo*. Cela nécessiterait par exemple le blocage pharmacologique de la voie de l'EGFR par le Gefitinib (Pao et al., 2004). L'étape d'activation des CSN quiescentes ne devrait pas être perturbée, et nous devrions observer une accumulation de CSN activées. Nous pourrions aller plus loin dans la compréhension des voies responsables de l'entrée en cycle des CSN quiescentes en comparant le transcriptome des CSN quiescentes LeX^{bright} avant et 48h après irradiation, au moment où elles s'activent. Il faudrait cependant exclure les marqueurs caractéristiques d'une réponse à l'irradiation. La découverte de nouvelles voies d'entrée en cycle précoce des CSN quiescentes pourrait être d'importance pour permettre la stimulation thérapeutique de la neurogenèse endogène.

3. Rôle du neurotransmetteur GABA dans le maintien de la quiescence des CSN.

3.1 Influence négative du GABA sur la prolifération des CSN *in vivo*.

Le neurotransmetteur GABA produit par les neuroblastes dans la ZSV est impliqué dans un mécanisme de signalisation paracrine bloquant la prolifération cellulaire dans la ZSV (Liu et al., 2005) (Nguyen et al., 2003). Les récepteurs au GABA étant exprimés sur les cellules de type astrocytaire peuplant la ZSV (Nguyen et al., 2003) (Bolteus and Bordey, 2004), incluant les CSN, il est important de se demander si les signaux GABAergiques peuvent avoir une influence sur le contrôle de leur prolifération. Une étude récente démontre l'existence d'une protéine, le DBI (diazepam binding inhibitor), exprimée principalement sur les cellules de type C, qui permet de contrer l'action inhibitrice des signaux GABA sur la prolifération, agissant ainsi comme un régulateur positif de la neurogenèse adulte (Alfonso et al., 2012). Ainsi, le GABA a peu d'influence sur les cellules de type C dans la ZSV mais aurait une influence plus spécifique sur les CSN. Fernando et ses collaborateurs supposent que l'auto-renouvellement des CSN ainsi que la taille de la niche peuvent être modulées par la voie du GABAAR. Ces observations sont déduites notamment du fait que le traitement par l'agoniste des récepteurs GABA muscimol entraîne la diminution du nombre de cellules GFAP+BrdU+ bordant le ventricule (et inversement avec l'antagoniste bicuculline) (Fernando et al., 2011). Ces expériences sont les premières réalisées *in vivo* sur l'influence de GABA sur la prolifération des CSN. Cependant, même si la prolifération des CSN activées semble être altérée par cette voie de signalisation, ces résultats ne montrent pas que le GABA agit sur l'activation des CSN quiescentes.

3.2 La voie de signalisation GABA_AR régule le statut de quiescence des CSN.

La preuve la plus probante de l'influence du neurotransmetteur GABA sur le contrôle de la balance quiescence/activation des CSN a été publiée très récemment. Ces

travaux montrent que dans l'hippocampe adulte, les CSN de la ZSG répondent à l'activation par le GABA via la sous unité gamma(2) des récepteurs GABA(A) (Song et al., 2012). La délétion conditionnelle de cette sous-unité gamma(2) entraîne une sortie de quiescence rapide des CSN de la ZSG et favorise leur division symétrique. Ils montrent aussi que l'activité des interneurons PV (parvalbumin-expressing interneurons) du gyrus denté peut dicter le choix des CSN à s'activer ou rester en quiescence par la libération de GABA (Song et al., 2012). Ainsi le GABA contrôle directement la quiescence de CSN dans la ZSG de l'hippocampe. Dans notre modèle d'irradiation de la ZSV, nous avons montré qu'une dose de 4Gy induit l'apoptose de la majorité des neuroblastes, éliminant ainsi la source de GABA dans la niche. La diminution de la concentration en GABA dans les niches n'a pas été prouvée, et nécessiterait l'utilisation de technique non invasives comme MEGA PRESS (Mescher et al., 1998), une technique de spectroscopie par résonance magnétique permettant de détecter les résonances faible du GABA (Edden and Barker, 2007).

Nous prouvons que l'administration *in vivo* de l'agoniste au GABAAR muscimol après irradiation retarde l'entrée en cycle des CSNs quiescentes. La reprise de la neurogenèse est retardée mais pas complètement bloquée, et les populations de progéniteurs prolifèrent normalement après ce délai pour repeupler la ZSV, confirmant la faible influence du GABA sur la polifération des progéniteurs (Alfonso et al., 2012). Le blocage de la voie GABAAR par la bicuculline *in vivo* favorise l'entrée en cycle des CSN quiescentes et la récupération de CSN activées et progéniteurs qui en résulte, mais n'a pas d'effet sur la récupération des neuroblastes. Ces résultats montrent que la voie de signalisation GABAAR agit spécifiquement sur les phases précoces d'activation et de prolifération des CSN. Ainsi, nous pouvons proposer un modèle d'après ces résultats sur la régulation de la taille des niches neurogéniques par la voie de signalisation GABAAR. Quand la niche contient suffisamment de neuroblastes, les CSN sont maintenues dans leur état de quiescence, et une perte des neuroblastes entraîne leur entrée en prolifération pour repeupler la niche. Ces résultats soulignent l'intérêt potentiel des drogues ciblant la voie de signalisation du GABAAR pour stimuler l'entrée en cycle des CSN adultes et développer de nouvelles thérapies régénératives du système nerveux central. Nous avons notamment montré que l'injection de l'antagoniste au GABAAR bicuculline permet d'accélérer l'entrée en cycle des CSN, en condition normale ou après

irradiation, ce qui pourrait en faire un bon candidat pour stimuler la neurogenèse endogène. Une question essentielle est de savoir si la stimulation de l'entrée en cycle des CSN quiescentes épuise le stock de CSN. Il faudrait vérifier si un traitement par la bicuculline sur plusieurs jours altère ou non le nombre de CSN à long terme.

4. Perturbation du cycle cellulaire des CSN au cours du vieillissement.

4.1 Le vieillissement n'altère pas le stock de CSN jusqu'aux adultes d'âge moyen mais perturbe leur prolifération

La voie de signalisation de l'EGFR est une voie majeure de régulation de la prolifération des CSN, et les niveaux d'expression de l'EGFR sont diminués dans le cerveau des souris âgées (23-25 mois), les cellules de type C expriment moins d'EGFR à leur membrane (Tropepe et al., 1997, Enwere et al., 2004). Cependant, nous remarquons que l'expression des transcrits de l'EGFR est similaire pour les populations de CSN activées et cellules de type C entre 2 mois (jeune adulte) et 12 mois (âge moyen). Ainsi, jusqu'à l'âge moyen, la diminution de la prolifération ne semble pas être due à une diminution de l'expression de l'EGFR. En revanche, nous mettons en évidence une maintenance du stock de CSN quiescentes et activées entre 2 et 12 mois alors que les stocks de progéniteurs et de neuroblastes diminuent sensiblement, en accord avec de précédentes études (Bouab et al., 2011) (Lugert et al., 2010). Les cellules de type C gardent leur capacité à proliférer et former des neurosphères *in vitro* et la proportion de cellules en prolifération dans les cellules de type C ne diminue que faiblement (-22%) alors qu'elle diminue fortement (-91%) dans les CSN activées. Ainsi, jusqu'à l'âge moyen, nous attribuons la diminution de la neurogenèse principalement à une perturbation de la prolifération des CSN plutôt que des cellules de type C, indépendamment de la voie de signalisation de l'EGFR.

4.2 L'allongement de la phase G1 des CSN activées est impliqué dans la réduction de la neurogenèse au cours du vieillissement.

La durée du cycle cellulaire des précurseurs neuronaux peuplant la ZSV a été estimée dans différents fonds génétiques murins. Morshead & van der Kooy (1992) estiment à 12,7h le temps de division entre deux progéniteurs de la ZSV de souris CD1 (Morshead and van der Kooy, 1992). Dans les souris ICR, leur durée de cycle a

été évaluée à 17h (Mori et al., 2012). Il a alors été supposé que la durée du cycle cellulaire pouvait varier en fonction des différentes souches murines. Nos résultats dans les souris C57Bl/6 se rapprochent des estimations de Morshead & van der Kooy (1992) avec 12,3h pour les CSN activées et 11,7h pour les cellules de type C. Nos estimations corroborent aussi celles de Costa et coll : 12,5h entre deux divisions *in vitro* chez les jeunes adultes C57Bl/6 en présence de facteurs de croissance EGF et FGF2 (Costa et al., 2011). Il faut noter que notre technique permet pour la première fois de distinguer les phases G1 et S-G2/M du cycle cellulaire des CSN activées et des cellules de type C, tout en s'intéressant à leur évolution au cours du vieillissement. Bouab et coll. interprètent la diminution du nombre de progéniteurs à une entrée progressive des CSN activées en quiescence (Bouab et al., 2011). Sans mettre en évidence une entrée en quiescence des CSN activées, nous remarquons un allongement significatif de leur phase G1 (+6,4h) entre 2 et 12 mois, alors que la durée de S-G2/M reste stable. Cet allongement spécifique de G1 est indépendant d'une entrée en différenciation ou en senescence. En revanche, les durées de G1 et S-G2/M des cellules de type C ne sont pas affectées. Ainsi, nous estimons que l'un des événements majeur menant au ralentissement de la neurogenèse avec le vieillissement est l'allongement de la phase G1 des CSN activées, perturbant leur entrée en S et leur prolifération alors que persiste l'expression de l'EGFR à leur membrane.

D'autre part, comme le stock de CSN quiescentes et activées reste inchangé entre 2 et 12 mois, nous supposons que les capacités de division asymétriques/symétriques des CSN ne sont pas altérées par le vieillissement. Cependant, il serait important pour la suite de ce travail de le vérifier. Des études de suivi de la descendance des CSN ont montré que les CSN activées sont capables de se diviser asymétriquement *in vitro* (Costa et al., 2011) et *in vivo* (Ponti et al., 2013), permettant de produire une cellule de type C, qui après deux ou trois divisions symétriques se différenciera en neuroblastes, ainsi qu'une nouvelle CSN activée. Les CSN activées sont aussi capable d'effectuer deux ou trois divisions symétriques *in vitro* pour augmenter leur stock avant de se différencier en cellules de type C (Costa et al., 2011). Les facteurs de croissance modifiant le mode de division des CSN (Costa et al., 2011), nous pourrions évaluer dans notre modèle souris Fucci *in vitro*, sans facteurs de croissance, les capacités de divisions symétriques et asymétriques des CSNs activées et leur évolution au cours du vieillissement.

5. Le TGFβ1 est un facteur majeur de vieillissement des CSN dans la ZSV

5.1 Allongement de la G1 par la voie TGFβ/Smad3

Nous démontrons que les chaînes TβR sont présentes à la fois sur les CSN et les cellules de type C. De plus, l'activation de la voie canonique TGFβ agit via la phosphorylation de Smad3 dans les CSN et les cellules de type C *in vivo* et *in vitro*. Bien que la phosphorylation de Smad3 soit déclenchée par les voies TGF-β, Activin et Nodal, nous remarquons que le seul blocage de la voie TGF-β suffit à bloquer la phosphorylation de Smad-3 chez les souris âgées. Chez les jeunes souris, nous remarquons que la perturbation du cycle cellulaire par le TGFβ1 est associée à un allongement de la phase G1 du cycle cellulaire des CSN activées et des cellules de type C, diminuant leur prolifération sans affecter leur clonogénicité. Nous mettons en évidence un allongement de la phase G1 sans blocage définitif en G1, qui pourrait être le signe d'une entrée en différenciation (Roccio et al., 2013). L'expression de la cycline D1 est stimulée par le TGFβ1 (Han et al., 1996) l'expression de la cyclinD1 augmente dans les neurosphères traitées avec du TGFβ1 (Pineda et al., 2013). Ces résultats sont surprenants car il a été montré que la surexpression de la cdk4/cyclinD1 raccourcit la G1 des CSN et favorise la production de progéniteurs nerveux (Lange et al., 2009). Si la surexpression de la cyclinD1 par le TGFβ1 reste à vérifier *in vivo* dans notre modèle, nous n'avons pas observé de changements dans l'expression de cdk4 entre 2 et 12 mois (article 4). Ainsi, une dérégulation de la balance cyclinD1/cdk4 pourrait expliquer l'allongement de la G1 induit par le TGFβ1.

5.2 Le blocage pharmacologique de la voie TGFβ/Smad3 rétablit la neurogenèse dans les niches de souris âgées

Le blocage de la voie TGF-β *in vivo* par des anticorps bloquants ou un inhibiteur sélectif du TβR Alk5, permet de rétablir la neurogenèse dans les souris âgées en favorisant l'entrée en cycle des CSNs (comme le montre l'augmentation de cellules CD24⁻GLAST⁺BrdU⁺ et CD24⁻LeX⁺BrdU⁺). Au niveau du cycle cellulaire, nous remarquons que le blocage *in vitro* et *in vivo* de la voie TGF-β raccourcit

spécifiquement la phase G1 des CSN activées âgées, rétablissant une durée de G1 comparable aux jeunes souris adultes. Nous avons vu que l'ajout de TGF- β 1 *in vitro* dans les cellules issues de jeunes souris adultes allonge la G1 des CSNs activées et des cellules de type C. Nous pouvons nous demander pourquoi la G1 est allongée seulement dans les LeX+EGFR+ *in vivo*. Nous avons prouvé que le TGF- β 1 augmente dans les niches vasculaires des souris âgées, en étant produit principalement par les cellules endothéliales. La spécificité de l'allongement de la G1 des CSN activées et non des progéniteurs au cours du vieillissement peut s'expliquer par le fait que même si l'on retrouve des groupes de cellules B1 et C en prolifération au bord des microvaisseaux de la niche (Tavazoie et al., 2008), seules les B1 contactent les cellules endothéliales, source de TGF β -1, grâce à leurs prolongements cytoplasmiques (Fuentealba et al., 2012). Ainsi, notre hypothèse est que seules les CSN activées ont accès au TGF- β 1 produit par la niche vasculaire dans le cerveau âgé. Cette hypothèse est renforcée par le fait que l'injection *in vivo* d'anti-TGF β rétablit une durée de G1 normale dans les CSN activées. Nous montrons ainsi que TGF- β /Smad3 est une voie de signalisation majeure conduisant au vieillissement des niches neurogéniques via une perturbation du cycle cellulaire des CSN activées. Il reste maintenant à disséquer les mécanismes intra-cellulaires qui contrôlent cet allongement de la G1 via la voie TGF β . De façon intéressante, l'allongement de la G1 dépendant de TGF β ne semble pas impliquer l'augmentation des cdk (cyclin-dépendent kinase) de la famille Cip/Kip, p21, p27 et p57. Une analyse transcriptomique comparant les CSN activées de jeunes souris et de souris âgées pourrait nous permettre de découvrir les régulateurs intra-cellulaires contrôlant l'allongement de la phase G1. Il reste aussi à évaluer le potentiel clinique du traitement anti-TGF- β , et notamment évaluer la fonctionnalité des nouveaux neurones produits par des tests comportementaux, en cours de réalisation. Le développement d'inhibiteurs de la voie TGF- β devient un sujet d'étude pour la thérapie contre le cancer (Yingling et al., 2004) et la voie TGF- β autocrine maintient la tumorigénicité des cellules initiatrices de gliomes (Seoane, 2009). Nos études montrent qu'il est nécessaire d'évaluer avec le plus grand intérêt le développement de thérapies anti-TGF- β pour aider à mieux contrôler la prolifération des CSN et rétablir la neurogenèse chez les personnes âgées atteintes de déclin cognitif.

CONCLUSION

L'utilisation de l'irradiation du cerveau à des doses modérées (2Gy/4Gy) constitue un puissant modèle de régénération de la ZSV, mis en place dans notre laboratoire, permettant de suivre toutes les étapes de la neurogenèse adulte, de l'entrée en cycle des CSN quiescentes à la migration des neuroblastes. Le suivi de ces étapes nécessite une caractérisation précise de tous les types cellulaires peuplant la niche neurogénique. Nous avons développé une technique de triple marquage LeX/CD24/EGFR des cellules de la ZSV, sans avoir recours à l'utilisation de souris transgéniques, qui permet de distinguer par cytométrie en flux les 5 principales populations de la niche neurogénique adulte dans la ZSV : Les CSN quiescentes (LeXbright) les CSN activées (LeX+EGFR+), les cellules de type C (EGFR+), les neuroblastes immatures (CD24+EGFR+) et les neuroblastes migrants (CD24+). C'est la première fois qu'une technique de tri par cytométrie en flux permet de purifier les deux populations de CSN peuplant la ZSV, ainsi que leurs cellules filles.

Les CSN quiescentes entrent en cycle après irradiation avant l'acquisition de l'EGFR et permettent de repeupler efficacement la ZSV. Cette étape de prolifération des CSN avant l'acquisition de l'EGFR montre que la voie de signalisation de l'EGFR n'est pas nécessaire à l'entrée en cycle des CSN quiescentes. L'activation des CSN quiescentes est en revanche fortement dépendante du niveau de GABA produit par les neuroblastes dans la niche. La perte des signaux GABA après irradiation due à la mort des neuroblastes favorise l'entrée en cycle des CSN quiescentes et l'activation des GABA_AR par un agoniste retarde la reprise de la neurogenèse. De plus, le blocage des GABA_AR par un antagoniste permet l'entrée en cycle des CSN quiescentes dans les souris non irradiées. Ainsi nous prouvons pour la première fois *in vivo* que la voie de signalisation du GABA_AR maintient les CSN dans leur état de quiescence en limitant leur activation, contrôlant ainsi l'intensité de la neurogenèse adulte.

La neurogenèse diminue fortement avec le vieillissement avec notamment une réduction progressive des cellules en prolifération et des neuroblastes dans la ZSV et les bulbes olfactifs des rongeurs (Enwere et al., 2004) (Tropepe et al., 1997). Nous

prouvons qu'un facteur majeur de vieillissement des niches neurogéniques est le TGF β -1 dont la production par les cellules endothéliales augmente au cours du vieillissement. L'activation de la voie de signalisation du TGF β /Smad3 dans les souris âgées perturbe le cycle cellulaire des CSN activées en allongeant spécifiquement leur phase G1. Le traitement in vivo et in vitro par des anticorps bloquants anti-TGF β permet de diminuer la durée de G1 des CSN activées et ainsi de rétablir la prolifération et la neurogenèse chez les souris âgées.

Les principales découvertes de ce travail de thèse sont schématisées dans la figure 17. Nous mettons en évidence deux acteurs majeurs de la régulation des CSN dans le cerveau adulte murin. Le neurotransmetteur GABA maintient les CSN en état de quiescence dans la niche alors que le TGF β 1 produit au cours du vieillissement allonge spécifiquement la G1 des CSN activées pour réduire la production de nouveaux neurones. L'association de ces deux facteurs pourrait expliquer le maintien du stock de CSN dans la ZSV jusqu'à l'entrée des cellules en senescence. Nous montrons aussi qu'il est possible de recruter le stock de CSN quiescentes pour rétablir la neurogenèse après un dommage comme l'irradiation ou dans le cerveau âgé. Ce travail pourrait aider au développement de thérapies ciblées sur les voies de signalisation du GABAAR et du TGF β -R pour stimuler la neurogenèse adulte.

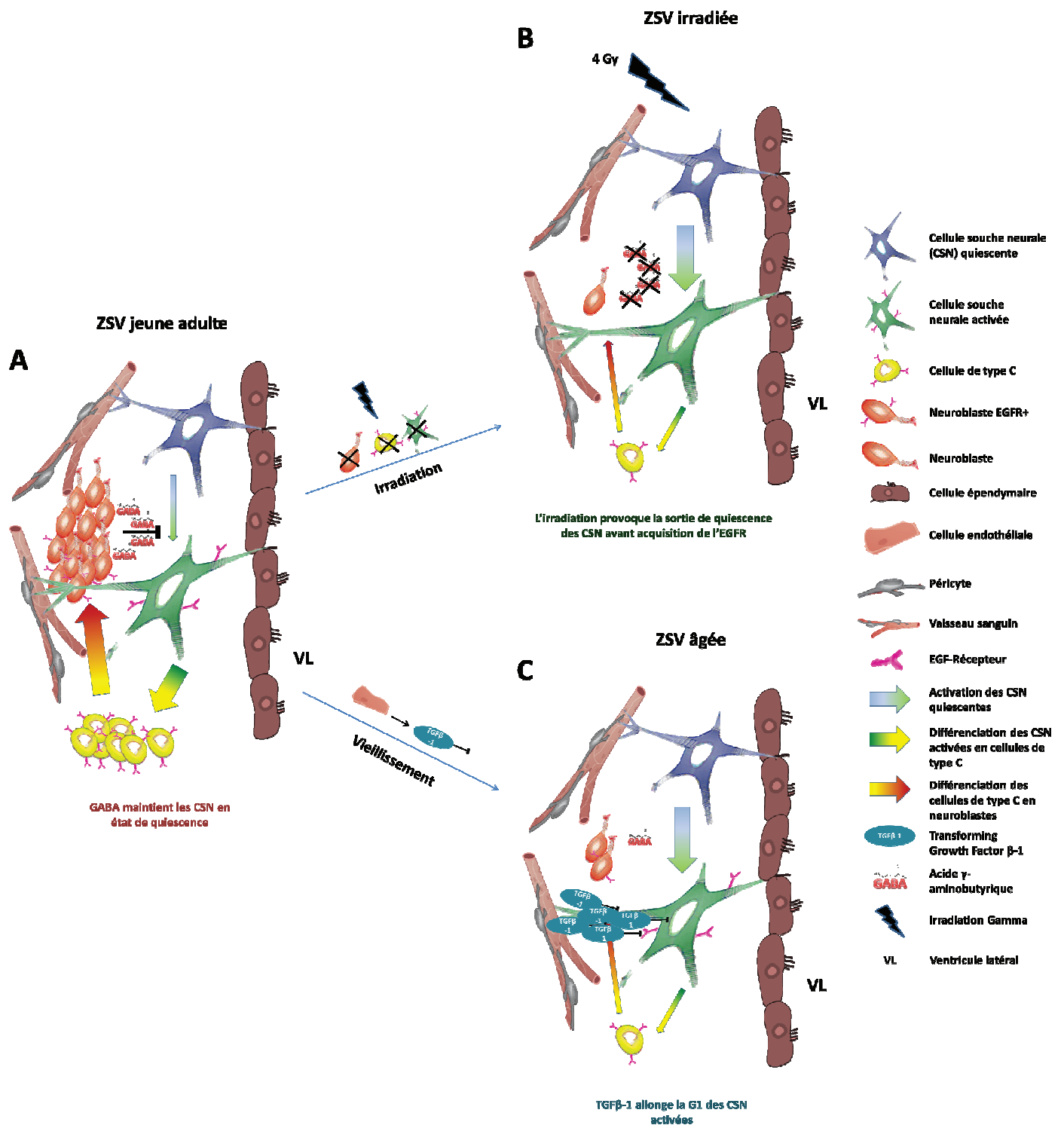


Figure 17 : GABA et TGFβ-1 sont deux régulateurs majeurs de la neurogenèse adulte.

(A) Dans la ZSV de jeunes adulte, le GABA produit par les neuroblastes dans la niche maintient les CSN dans leur état de quiescence. (B) L'irradiation gamma fait rentrer en apoptose les CSN activées, les cellules de type C et les neuroblastes. Les CSN quiescentes résistent au traitement et la perte des signaux GABA favorise leur sortie de quiescence. (C) Au cours du vieillissement, les cellules endothéliales produisent du TGFβ-1 qui perturbe spécifiquement la prolifération des CSN activées, ce qui entraîne une perte progressive du nombre de cellules de type C et de neuroblastes.

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Version révisée par Bystron et al. (Bystron et al., 2008) du modèle de développement néocortical humain proposé lors du comité Boulder en 1970.....	14
Figure 2 : Neurogenèse au cours du développement du cerveau	16
Figure 3 : Origine des cellules des zones sous-ventriculaires du cerveau adulte.....	16
Figure 4 : Principales zones de neurogenèse dans le cerveau adulte murin.....	17
Figure 5 : Neurogenèse dans l'hippocampe adulte	19
Figure 6 : Neurogenèse de la zone sous-ventriculaire vers les bulbes olfactifs.....	22
Figure 7 : Composition cellulaire des niches neurogéniques dans la ZSV et la ZSG	28
Figure 8 : Schéma des 3 différents domaines des cellules de type B dans la ZSV murine adulte.....	30
Figure 9 : Régulation physiologique et physiopathologique de la neurogenèse adulte	39
Figure 10 : Effets-doses de l'irradiation sur la neurogenèse dans la ZSV et la ZSG	43
Figure 11 : Représentation schématique des effets du vieillissement sur la ZSV.....	46
Figure 12 : Stimulation de la prolifération des CSN et progéniteurs dans la ZSV	48
Figure 13 : Signaux glutamatergiques et GABAergiques dans la ZSV	55
Figure 14 : Evolution du stock de cellules peuplant la ZSV au cours du vieillissement	168
Figure 15 : Evolution de la proportion de cellules en S-G2/M parmi les populations peuplant la ZSV au cours du vieillissement	169
Figure 16 : Reprise de la neurogenèse après irradiation (4Gy) dans les jeunes adultes (2 mois) et les adultes d'âge moyen (12 mois).....	170
Figure 17 : GABA et TGFβ-1 sont deux régulateurs majeurs de la neurogenèse adulte.....	215
Tableau 1 : Autres zones de neurogenèse dans le cerveau adulte	26
Tableau 2 : Principaux marqueurs des CSN et leurs cellules filles dans la ZSV	35
Tableau 3 : Régulation des phases précoces de la neurogenèse adulte dans la ZSV	62

LISTE DES ABBREVIATIONS

BO	Bulbes olfactifs
CA3	Cornu ammonis 3
Cdk	Kinase dépendante des cyclines
CSN	Cellule souche neurale
Dcx	Doublecortine
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
GABA	Acide γ -aminobutyrique
GCL	Couche de cellules granulaires
Gy	Gray (= $J.Kg^{-1}$)
LeX	Antigène LewisX
LGE	Eminences ganglionnaires latérales
MGE	Eminences ganglionnaires médianes
NE	Cellules neuroépithéliales
RMS	Chemin de migration tostral (Rostral migratory stream)
TAC	Cellule de type C (transit-amplifying cell)
ZI	Zone intermédiaire
ZSG	Zone sous-granulaire
ZSV	Zone sous-ventriculaire
ZV	Zone ventriculaire

BIBLIOGRAPHIE

- (1970) Embryonic vertebrate central nervous system: revised terminology. The Boulder Committee. *Anat Rec* 166:257-261.
- Ables JL, Breunig JJ, Eisch AJ, Rakic P (2011) Not(ch) just development: Notch signalling in the adult brain. *Nat Rev Neurosci* 12:269-283.
- Ables JL, Decarolis NA, Johnson MA, Rivera PD, Gao Z, Cooper DC, Radtke F, Hsieh J, Eisch AJ (2010) Notch1 is required for maintenance of the reservoir of adult hippocampal stem cells. *J Neurosci* 30:10484-10492.
- Achanta P, Capilla-Gonzalez V, Purger D, Reyes J, Sailor K, Song H, Garcia-Verdugo JM, Gonzalez-Perez O, Ford E, Quinones-Hinojosa A (2012) Subventricular zone localized irradiation affects the generation of proliferating neural precursor cells and the migration of neuroblasts. *Stem Cells* 30:2548-2560.
- Adachi K, Mirzadeh Z, Sakaguchi M, Yamashita T, Nikolcheva T, Gotoh Y, Peltz G, Gong L, Kawase T, Alvarez-Buylla A, Okano H, Sawamoto K (2007) Beta-catenin signaling promotes proliferation of progenitor cells in the adult mouse subventricular zone. *Stem Cells* 25:2827-2836.
- Ahlenius H, Visan V, Kokaia M, Lindvall O, Kokaia Z (2009) Neural stem and progenitor cells retain their potential for proliferation and differentiation into functional neurons despite lower number in aged brain. *J Neurosci* 29:4408-4419.
- Ahn S, Joyner AL (2005) In vivo analysis of quiescent adult neural stem cells responding to Sonic hedgehog. *Nature* 437:894-897.
- Alfonso J, Le Magueresse C, Zuccotti A, Khodosevich K, Monyer H (2012) Diazepam binding inhibitor promotes progenitor proliferation in the postnatal SVZ by reducing GABA signaling. *Cell Stem Cell* 10:76-87.
- Alonso M, Viollet C, Gabellec MM, Meas-Yedid V, Olivo-Marin JC, Lledo PM (2006) Olfactory discrimination learning increases the survival of adult-born neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci* 26:10508-10513.
- Altman J (1962) Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 135:1127-1128.
- Altman J (1963) Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *Anat Rec* 145:573-591.
- Altman J (1969) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. 3. Dating the time of production and onset of differentiation of cerebellar microneurons in rats. *J Comp Neurol* 136:269-293.
- Altman J, Bayer SA (1990) Mosaic organization of the hippocampal neuroepithelium and the multiple germinal sources of dentate granule cells. *J Comp Neurol* 301:325-342.
- Altman J, Das GD (1965) Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature* 207:953-956.
- Andres-Mach M, Rola R, Fike JR (2008) Radiation effects on neural precursor cells in the dentate gyrus. *Cell Tissue Res* 331:251-262.
- Andreu-Agullo C, Morante-Redolat JM, Delgado AC, Farinas I (2009) Vascular niche factor PEDF modulates Notch-dependent stemness in the adult subependymal zone. *Nat Neurosci* 12:1514-1523.
- Arellano JJ, Rakic P (2011) Neuroscience: Gone with the wean. *Nature* 478:333-334.
- Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O (2002) Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 8:963-970.

- Baker SA, Baker KA, Hagg T (2004) Dopaminergic nigrostriatal projections regulate neural precursor proliferation in the adult mouse subventricular zone. *Eur J Neurosci* 20:575-579.
- Baker SA, Baker KA, Hagg T (2005) D3 dopamine receptors do not regulate neurogenesis in the subventricular zone of adult mice. *Neurobiol Dis* 18:523-527.
- Banasr M, Hery M, Printemps R, Daszuta A (2004) Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone. *Neuropsychopharmacology* 29:450-460.
- Barkho BZ, Zhao X (2011) Adult neural stem cells: response to stroke injury and potential for therapeutic applications. *Current stem cell research & therapy* 6:327-338.
- Barnes NM, Sharp T (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38:1083-1152.
- Beckervordersandforth R, Tripathi P, Ninkovic J, Bayam E, Lepier A, Stempfhuber B, Kirchhoff F, Hirrlinger J, Haslinger A, Lie DC, Beckers J, Yoder B, Irmeler M, Gotz M (2010) In vivo fate mapping and expression analysis reveals molecular hallmarks of prospectively isolated adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* 7:744-758.
- Behar TN, Schaffner AE, Colton CA, Somogyi R, Olah Z, Lehel C, Barker JL (1994) GABA-induced chemokinesis and NGF-induced chemotaxis of embryonic spinal cord neurons. *J Neurosci* 14:29-38.
- Behar TN, Schaffner AE, Scott CA, O'Connell C, Barker JL (1998) Differential response of cortical plate and ventricular zone cells to GABA as a migration stimulus. *J Neurosci* 18:6378-6387.
- Bergmann O, Liebl J, Bernard S, Alkass K, Yeung MS, Steier P, Kutschera W, Johnson L, Landen M, Druid H, Spalding KL, Frisen J (2012) The age of olfactory bulb neurons in humans. *Neuron* 74:634-639.
- Beukelaers P, Vandenbosch R, Caron N, Nguyen L, Belachew S, Moonen G, Kiyokawa H, Barbacid M, Santamaria D, Malgrange B (2011) Cdk6-dependent regulation of G(1) length controls adult neurogenesis. *Stem Cells* 29:713-724.
- Beukelaers P, Vandenbosch R, Caron N, Nguyen L, Moonen G, Malgrange B (2012) Cycling or not cycling: cell cycle regulatory molecules and adult neurogenesis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69:1493-1503.
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279:349-352.
- Bolteus AJ, Bordey A (2004) GABA release and uptake regulate neuronal precursor migration in the postnatal subventricular zone. *J Neurosci* 24:7623-7631.
- Bondolfi L, Ermini F, Long JM, Ingram DK, Jucker M (2004) Impact of age and caloric restriction on neurogenesis in the dentate gyrus of C57BL/6 mice. *Neurobiol Aging* 25:333-340.
- Bouab M, Paliouras GN, Aumont A, Forest-Berard K, Fernandes KJ (2011) Aging of the subventricular zone neural stem cell niche: evidence for quiescence-associated changes between early and mid-adulthood. *Neuroscience* 173:135-149.
- Breunig JJ, Silbereis J, Vaccarino FM, Sestan N, Rakic P (2007) Notch regulates cell fate and dendrite morphology of newborn neurons in the postnatal dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:20558-20563.
- Bystron I, Rakic P, Molnar Z, Blakemore C (2006) The first neurons of the human cerebral cortex. *Nat Neurosci* 9:880-886.
- Callier S, Snapyan M, Le Crom S, Prou D, Vincent JD, Vernier P (2003) Evolution and cell biology of dopamine receptors in vertebrates. *Biol Cell* 95:489-502.

- Cameron HA, McEwen BS, Gould E (1995) Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus. *J Neurosci* 15:4687-4692.
- Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E (1993) Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 56:337-344.
- Capela A, Temple S (2002) LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal. *Neuron* 35:865-875.
- Caporaso GL, Lim DA, Alvarez-Buylla A, Chao MV (2003) Telomerase activity in the subventricular zone of adult mice. *Mol Cell Neurosci* 23:693-702.
- Carleton A, Petreanu LT, Lansford R, Alvarez-Buylla A, Lledo PM (2003) Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat Neurosci* 6:507-518.
- Cavanagh JB, Hopewell JW (1972) Mitotic activity in the subependymal plate of rats and the long-term consequences of X-irradiation. *J Neurol Sci* 15:471-482.
- Caviness VS, Jr., Rakic P (1978) Mechanisms of cortical development: a view from mutations in mice. *Annu Rev Neurosci* 1:297-326.
- Chapouton P, Skupien P, Hesl B, Coolen M, Moore JC, Madelaine R, Kremmer E, Faus-Kessler T, Blader P, Lawson ND, Bally-Cuif L (2010) Notch activity levels control the balance between quiescence and recruitment of adult neural stem cells. *J Neurosci* 30:7961-7974.
- Chebib M, Johnston GA (1999) The 'ABC' of GABA receptors: a brief review. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26:937-940.
- Cheng T, Rodrigues N, Shen H, Yang Y, Dombkowski D, Sykes M, Scadden DT (2000) Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21^{cip1}/waf1. *Science* 287:1804-1808.
- Chenn A, McConnell SK (1995) Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis. *Cell* 82:631-641.
- Ciarrocchi A, Jankovic V, Shaked Y, Nolan DJ, Mittal V, Kerbel RS, Nimer SD, Benezra R (2007) Id1 restrains p21 expression to control endothelial progenitor cell formation. *PLoS One* 2:e1338.
- Ciccolini F, Mandl C, Holzl-Wenig G, Kehlenbach A, Hellwig A (2005) Prospective isolation of late development multipotent precursors whose migration is promoted by EGFR. *Dev Biol* 284:112-125.
- Colak D, Mori T, Brill MS, Pfeifer A, Falk S, Deng C, Monteiro R, Mummery C, Sommer L, Gotz M (2008) Adult neurogenesis requires Smad4-mediated bone morphogenic protein signaling in stem cells. *J Neurosci* 28:434-446.
- Conn PJ, Pin JP (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:205-237.
- Conover JC, Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Gale NW, Yancopoulos GD, Alvarez-Buylla A (2000) Disruption of Eph/ephrin signaling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone. *Nat Neurosci* 3:1091-1097.
- Coronas V, Bantubungi K, Fombonne J, Krantic S, Schiffmann SN, Roger M (2004) Dopamine D3 receptor stimulation promotes the proliferation of cells derived from the post-natal subventricular zone. *J Neurochem* 91:1292-1301.
- Corotto FS, Henegar JR, Maruniak JA (1994) Odor deprivation leads to reduced neurogenesis and reduced neuronal survival in the olfactory bulb of the adult mouse. *Neuroscience* 61:739-744.
- Costa MR, Ortega F, Brill MS, Beckervordersandforth R, Petrone C, Schroeder T, Gotz M, Berninger B (2011) Continuous live imaging of adult neural stem cell division and lineage progression in vitro. *Development* 138:1057-1068.

- Cuppini R, Bucherelli C, Ambrogini P, Ciuffoli S, Orsini L, Ferri P, Baldi E (2006) Age-related naturally occurring depression of hippocampal neurogenesis does not affect trace fear conditioning. *Hippocampus* 16:141-148.
- Curtis MA, Kam M, Nannmark U, Anderson MF, Axell MZ, Wikkelsø C, Holtas S, van Roon-Mom WM, Bjork-Eriksson T, Nordborg C, Frisen J, Dragunow M, Faull RL, Eriksson PS (2007) Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science* 315:1243-1249.
- Daynac M, Chicheportiche A, Pineda JR, Gauthier LR, Boussin FD, Mouthon MA (2013) Quiescent neural stem cells exit dormancy upon alteration of GABAR signaling following radiation damage. *Stem cell research* 11:516-528.
- Deng W, Aimone JB, Gage FH (2010) New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci* 11:339-350.
- Di Giorgi-Gerevini V, Melchiorri D, Battaglia G, Ricci-Vitiani L, Ciceroni C, Busceti CL, Biagioni F, Iacovelli L, Canudas AM, Parati E, De Maria R, Nicoletti F (2005) Endogenous activation of metabotropic glutamate receptors supports the proliferation and survival of neural progenitor cells. *Cell Death Differ* 12:1124-1133.
- Di Giorgi Gerevini VD, Caruso A, Cappuccio I, Ricci Vitiani L, Romeo S, Della Rocca C, Gradini R, Melchiorri D, Nicoletti F (2004) The mGlu5 metabotropic glutamate receptor is expressed in zones of active neurogenesis of the embryonic and postnatal brain. *Brain Res Dev Brain Res* 150:17-22.
- Diaz J, Ridray S, Mignon V, Griffon N, Schwartz JC, Sokoloff P (1997) Selective expression of dopamine D3 receptor mRNA in proliferative zones during embryonic development of the rat brain. *J Neurosci* 17:4282-4292.
- Dickinson ME, Krumlauf R, McMahon AP (1994) Evidence for a mitogenic effect of Wnt-1 in the developing mammalian central nervous system. *Development* 120:1453-1471.
- Ding HF, Fisher DE (1998) Mechanisms of p53-mediated apoptosis. *Crit Rev Oncog* 9:83-98.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22:391-397.
- Doetsch F (2003) The glial identity of neural stem cells. *Nat Neurosci* 6:1127-1134.
- Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999a) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97:703-716.
- Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1997) Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17:5046-5061.
- Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999b) Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11619-11624.
- Doetsch F, Petreanu L, Caille I, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2002) EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* 36:1021-1034.
- Duittoz AH, Hevor T (2001) Primary culture of neural precursors from the ovine central nervous system (CNS). *Journal of neuroscience methods* 107:131-140.
- Edden RA, Barker PB (2007) Spatial effects in the detection of gamma-aminobutyric acid: improved sensitivity at high fields using inner volume saturation. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine* 58:1276-1282.
- Eisch AJ, Cameron HA, Encinas JM, Meltzer LA, Ming GL, Overstreet-Wadiche LS (2008) Adult neurogenesis, mental health, and mental illness: hope or hype? *J Neurosci* 28:11785-11791.

- el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75:817-825.
- Emsley HC, Smith CJ, Georgiou RF, Vail A, Tyrrell PJ, Barberan EM, Rothwell NJ, Hopkins SJ (2005) Correlation of systemic inflammatory response with infarct volume in acute ischemic stroke patients. *Stroke* 36:228-229; author reply 228-229.
- Enwere E, Shingo T, Gregg C, Fujikawa H, Ohta S, Weiss S (2004) Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signaling, diminished olfactory neurogenesis, and deficits in fine olfactory discrimination. *J Neurosci* 24:8354-8365.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4:1313-1317.
- Esposito MS, Piatti VC, Laplagne DA, Morgenstern NA, Ferrari CC, Pitossi FJ, Schinder AF (2005) Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J Neurosci* 25:10074-10086.
- Fallon J, Reid S, Kinyamu R, Opole I, Opole R, Baratta J, Korc M, Endo TL, Duong A, Nguyen G, Karkehabadhi M, Twardzik D, Patel S, Loughlin S (2000) In vivo induction of massive proliferation, directed migration, and differentiation of neural cells in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:14686-14691.
- Fasano CA, Dimos JT, Ivanova NB, Lowry N, Lemischka IR, Temple S (2007) shRNA knockdown of Bmi-1 reveals a critical role for p21-Rb pathway in NSC self-renewal during development. *Cell Stem Cell* 1:87-99.
- Favaro R, Valotta M, Ferri AL, Latorre E, Mariani J, Giachino C, Lancini C, Tosetti V, Ottolenghi S, Taylor V, Nicolis SK (2009) Hippocampal development and neural stem cell maintenance require Sox2-dependent regulation of Shh. *Nat Neurosci* 12:1248-1256.
- Feierstein CE, Lazarini F, Wagner S, Gabellec MM, de Chaumont F, Olivo-Marin JC, Boussin FD, Lledo PM, Gheusi G (2010) Disruption of Adult Neurogenesis in the Olfactory Bulb Affects Social Interaction but not Maternal Behavior. *Frontiers in behavioral neuroscience* 4:176.
- Fernando RN, Eleuteri B, Abdelhady S, Nussenzweig A, Andang M, Ernfors P (2011) Cell cycle restriction by histone H2AX limits proliferation of adult neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:5837-5842.
- Ferron S, Mira H, Franco S, Cano-Jaimez M, Bellmunt E, Ramirez C, Farinas I, Blasco MA (2004) Telomere shortening and chromosomal instability abrogates proliferation of adult but not embryonic neural stem cells. *Development* 131:4059-4070.
- Ford EC, Achanta P, Purger D, Armour M, Reyes J, Fong J, Kleinberg L, Redmond K, Wong J, Jang MH, Jun H, Song HJ, Quinones-Hinojosa A (2011) Localized CT-guided irradiation inhibits neurogenesis in specific regions of the adult mouse brain. *Radiat Res* 175:774-783.
- Fuentealba LC, Obernier K, Alvarez-Buylla A (2012) Adult neural stem cells bridge their niche. *Cell Stem Cell* 10:698-708.
- Gabay L, Lowell S, Rubin LL, Anderson DJ (2003) Deregulation of dorsoventral patterning by FGF confers trilineage differentiation capacity on CNS stem cells in vitro. *Neuron* 40:485-499.
- Gadir N, Lee E, Garcia A, Toschi A, Foster DA (2007) Suppression of TGF-beta signaling by phospholipase D. *Cell Cycle* 6:2840-2845.
- Garcia-Moreno F, Lopez-Mascaraque L, De Carlos JA (2007) Origins and migratory routes of murine Cajal-Retzius cells. *J Comp Neurol* 500:419-432.

- Garcia AD, Doan NB, Imura T, Bush TG, Sofroniew MV (2004) GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci* 7:1233-1241.
- Ge S, Yang CH, Hsu KS, Ming GL, Song H (2007) A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron* 54:559-566.
- Gheusi G, Cremer H, McLean H, Chazal G, Vincent JD, Lledo PM (2000) Importance of newly generated neurons in the adult olfactory bulb for odor discrimination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1823-1828.
- Gil-Perotin S, Duran-Moreno M, Belzunegui S, Luquin MR, Garcia-Verdugo JM (2009) Ultrastructure of the subventricular zone in *Macaca fascicularis* and evidence of a mouse-like migratory stream. *J Comp Neurol* 514:533-554.
- Gil-Perotin S, Marin-Husstege M, Li J, Soriano-Navarro M, Zindy F, Roussel MF, Garcia-Verdugo JM, Casaccia-Bonnet P (2006) Loss of p53 induces changes in the behavior of subventricular zone cells: implication for the genesis of glial tumors. *J Neurosci* 26:1107-1116.
- Gomes FC, Sousa Vde O, Romao L (2005) Emerging roles for TGF-beta1 in nervous system development. *Int J Dev Neurosci* 23:413-424.
- Goritz C, Frisen J (2012) Neural stem cells and neurogenesis in the adult. *Cell Stem Cell* 10:657-659.
- Gould E, Cameron HA, McEwen BS (1994) Blockade of NMDA receptors increases cell death and birth in the developing rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 340:551-565.
- Gregorian C, Nakashima J, Le Belle J, O'hab J, Kim R, Liu A, Smith KB, Groszer M, Garcia AD, Sofroniew MV, Carmichael ST, Kornblum HI, Liu X, Wu H (2009) Pten deletion in adult neural stem/progenitor cells enhances constitutive neurogenesis. *J Neurosci* 29:1874-1886.
- Groszer M, Erickson R, Scripture-Adams DD, Dougherty JD, Le Belle J, Zack JA, Geschwind DH, Liu X, Kornblum HI, Wu H (2006) PTEN negatively regulates neural stem cell self-renewal by modulating G0-G1 cell cycle entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:111-116.
- Guentchev M, McKay RD (2006) Notch controls proliferation and differentiation of stem cells in a dose-dependent manner. *Eur J Neurosci* 23:2289-2296.
- Guerrero-Cazares H, Gonzalez-Perez O, Soriano-Navarro M, Zamora-Berridi G, Garcia-Verdugo JM, Quinones-Hinojosa A (2011) Cytoarchitecture of the lateral ganglionic eminence and rostral extension of the lateral ventricle in the human fetal brain. *J Comp Neurol* 519:1165-1180.
- Hack MA, Saghatelian A, de Chevigny A, Pfeifer A, Ashery-Padan R, Lledo PM, Gotz M (2005) Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. *Nat Neurosci* 8:865-872.
- Han H, Nomura T, Honjo T, Tsubata T (1996) Differential modulation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 by negative signaling via the antigen receptor of B cells and positive signaling via CD40. *European journal of immunology* 26:2425-2432.
- Hastings NB, Seth MI, Tanapat P, Rydel TA, Gould E (2002) Granule neurons generated during development extend divergent axon collaterals to hippocampal area CA3. *J Comp Neurol* 452:324-333.
- Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M (1997) Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387:296-299.
- Haydar TF, Wang F, Schwartz ML, Rakic P (2000) Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones. *J Neurosci* 20:5764-5774.

- Hellstrom NA, Bjork-Eriksson T, Blomgren K, Kuhn HG (2009) Differential recovery of neural stem cells in the subventricular zone and dentate gyrus after ionizing radiation. *Stem Cells* 27:634-641.
- Hennen E, Czopka T, Faissner A (2011) Structurally distinct LewisX glycans distinguish subpopulations of neural stem/progenitor cells. *The Journal of biological chemistry* 286:16321-16331.
- Hinds JW (1968) Autoradiographic study of histogenesis in the mouse olfactory bulb. II. Cell proliferation and migration. *J Comp Neurol* 134:305-322.
- Hirabayashi Y, Gotoh Y (2005) Stage-dependent fate determination of neural precursor cells in mouse forebrain. *Neurosci Res* 51:331-336.
- Hoglinger GU, Rizk P, Muriel MP, Duyckaerts C, Oertel WH, Caille I, Hirsch EC (2004) Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat Neurosci* 7:726-735.
- Holmberg J, Armulik A, Senti KA, Edoff K, Spalding K, Momba S, Cassidy R, Flanagan JG, Frisen J (2005) Ephrin-A2 reverse signaling negatively regulates neural progenitor proliferation and neurogenesis. *Genes Dev* 19:462-471.
- Hopewell JW (1979) Late radiation damage to the central nervous system: a radiobiological interpretation. *Neuropathol Appl Neurobiol* 5:329-343.
- Hopewell JW, Cavanagh JB (1972) Effects of X irradiation on the mitotic activity of the subependymal plate of rats. *Br J Radiol* 45:461-465.
- Hu Q, Zhang L, Wen J, Wang S, Li M, Feng R, Yang X, Li L (2010) The EGF receptor-sox2-EGF receptor feedback loop positively regulates the self-renewal of neural precursor cells. *Stem Cells* 28:279-286.
- Huang TS, Wang YH, Lee SH, Lai JS (1998) Impaired hypothalamus-pituitary-adrenal axis in men with spinal cord injuries. *American journal of physical medicine & rehabilitation / Association of Academic Physiatrists* 77:108-112.
- Imayoshi I, Sakamoto M, Yamaguchi M, Mori K, Kageyama R (2010) Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains. *J Neurosci* 30:3489-3498.
- Imura T, Nakano I, Kornblum HI, Sofroniew MV (2006) Phenotypic and functional heterogeneity of GFAP-expressing cells in vitro: differential expression of LeX/CD15 by GFAP-expressing multipotent neural stem cells and non-neurogenic astrocytes. *Glia* 53:277-293.
- Jaskelioff M, Muller FL, Paik JH, Thomas E, Jiang S, Adams AC, Sahin E, Kost-Alimova M, Protopopov A, Cadinanos J, Horner JW, Maratos-Flier E, Depinho RA (2011) Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice. *Nature* 469:102-106.
- Jessberger S, Gage FH (2008) Stem-cell-associated structural and functional plasticity in the aging hippocampus. *Psychology and aging* 23:684-691.
- Jiao J, Chen DF (2008) Induction of neurogenesis in nonconventional neurogenic regions of the adult central nervous system by niche astrocyte-produced signals. *Stem Cells* 26:1221-1230.
- Jin K, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Batteur S, Simon RP, Greenberg DA (2001) Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:4710-4715.
- Jin K, Sun Y, Xie L, Batteur S, Mao XO, Smelick C, Logvinova A, Greenberg DA (2003a) Neurogenesis and aging: FGF-2 and HB-EGF restore neurogenesis in hippocampus and subventricular zone of aged mice. *Aging Cell* 2:175-183.

- Jin K, Sun Y, Xie L, Peel A, Mao XO, Batteur S, Greenberg DA (2003b) Directed migration of neuronal precursors into the ischemic cerebral cortex and striatum. *Mol Cell Neurosci* 24:171-189.
- Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA (2002) Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11946-11950.
- Kawaguchi A, Miyata T, Sawamoto K, Takashita N, Murayama A, Akamatsu W, Ogawa M, Okabe M, Tano Y, Goldman SA, Okano H (2001) Nestin-EGFP transgenic mice: visualization of the self-renewal and multipotency of CNS stem cells. *Mol Cell Neurosci* 17:259-273.
- Kawaguchi D, Furutachi S, Kawai H, Hozumi K, Gotoh Y (2013) Dll1 maintains quiescence of adult neural stem cells and segregates asymmetrically during mitosis. *Nature communications* 4:1880.
- Kelsch W, Lin CW, Lois C (2008) Sequential development of synapses in dendritic domains during adult neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:16803-16808.
- Kempermann G (2012) New neurons for 'survival of the fittest'. *Nat Rev Neurosci* 13:727-736.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1998) Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci* 18:3206-3212.
- Kempermann G, Wiskott L, Gage FH (2004) Functional significance of adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 14:186-191.
- Kernie SG, Parent JM (2010) Forebrain neurogenesis after focal Ischemic and traumatic brain injury. *Neurobiol Dis* 37:267-274.
- Kim Y, Comte I, Szabo G, Hockberger P, Szele FG (2009) Adult mouse subventricular zone stem and progenitor cells are sessile and epidermal growth factor receptor negatively regulates neuroblast migration. *PLoS One* 4:e8122.
- Kippin TE, Martens DJ, van der Kooy D (2005) p21 loss compromises the relative quiescence of forebrain stem cell proliferation leading to exhaustion of their proliferation capacity. *Genes Dev* 19:756-767.
- Knoth R, Singec I, Ditter M, Pantazis G, Capetian P, Meyer RP, Horvat V, Volk B, Kempermann G (2010) Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years. *PLoS One* 5:e8809.
- Kohman RA, Rodriguez-Zas SL, Southey BR, Kelley KW, Dantzer R, Rhodes JS (2011) Voluntary wheel running reverses age-induced changes in hippocampal gene expression. *PLoS One* 6:e22654.
- Kokaia Z, Lindvall O (2003) Neurogenesis after ischaemic brain insults. *Curr Opin Neurobiol* 13:127-132.
- Kokoeva MV, Yin H, Flier JS (2005) Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science* 310:679-683.
- Kondo T, Raff M (2000) Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. *Science* 289:1754-1757.
- Kriegstein A, Alvarez-Buylla A (2009) The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci* 32:149-184.
- Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, Kovalev GI, Al-Regaiey K, Su L, Sharpless NE (2004) Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *The Journal of clinical investigation* 114:1299-1307.
- Kuge A, Takemura S, Kokubo Y, Sato S, Goto K, Kayama T (2009) Temporal profile of neurogenesis in the subventricular zone, dentate gyrus and cerebral cortex following transient focal cerebral ischemia. *Neurological research* 31:969-976.

- Kukekov VG, Laywell ED, Suslov O, Davies K, Scheffler B, Thomas LB, O'Brien TF, Kusakabe M, Steindler DA (1999) Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain. *Exp Neurol* 156:333-344.
- Kuwabara T, Hsieh J, Muotri A, Yeo G, Warashina M, Lie DC, Moore L, Nakashima K, Asashima M, Gage FH (2009) Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis. *Nat Neurosci* 12:1097-1105.
- Lai K, Kaspar BK, Gage FH, Schaffer DV (2003) Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat Neurosci* 6:21-27.
- Lange C, Huttner WB, Calegari F (2009) Cdk4/cyclinD1 overexpression in neural stem cells shortens G1, delays neurogenesis, and promotes the generation and expansion of basal progenitors. *Cell Stem Cell* 5:320-331.
- Lazarini F, Mouthon MA, Gheusi G, de Chaumont F, Olivo-Marin JC, Lamarque S, Abrous DN, Boussin FD, Lledo PM (2009) Cellular and behavioral effects of cranial irradiation of the subventricular zone in adult mice. *PLoS One* 4:e7017.
- Lee KJ, Jessell TM (1999) The specification of dorsal cell fates in the vertebrate central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 22:261-294.
- Legrier ME, Ducray A, Propper A, Kastner A (2001) Region-specific expression of cell cycle inhibitors in the adult brain. *Neuroreport* 12:3127-3131.
- Lehtinen MK, Walsh CA (2011) Neurogenesis at the brain-cerebrospinal fluid interface. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27:653-679.
- Lemaire V, Koehl M, Le Moal M, Abrous DN (2000) Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11032-11037.
- Leonard BW, Mastroeni D, Grover A, Liu Q, Yang K, Gao M, Wu J, Pootrakul D, van den Berge SA, Hol EM, Rogers J (2009) Subventricular zone neural progenitors from rapid brain autopsies of elderly subjects with and without neurodegenerative disease. *J Comp Neurol* 515:269-294.
- Li G, Fang L, Fernandez G, Pleasure SJ (2013) The ventral hippocampus is the embryonic origin for adult neural stem cells in the dentate gyrus. *Neuron* 78:658-672.
- Li G, Pleasure SJ (2005) Morphogenesis of the dentate gyrus: what we are learning from mouse mutants. *Dev Neurosci* 27:93-99.
- Li L, Clevers H (2010) Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science* 327:542-545.
- Li S, Sun G, Murai K, Ye P, Shi Y (2012) Characterization of TLX expression in neural stem cells and progenitor cells in adult brains. *PLoS One* 7:e43324.
- Lichtenwalner RJ, Forbes ME, Bennett SA, Lynch CD, Sonntag WE, Riddle DR (2001) Intracerebroventricular infusion of insulin-like growth factor-I ameliorates the age-related decline in hippocampal neurogenesis. *Neuroscience* 107:603-613.
- Lie DC, Colamarino SA, Song HJ, Desire L, Mira H, Consiglio A, Lein ES, Jessberger S, Lansford H, Dearie AR, Gage FH (2005) Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature* 437:1370-1375.
- Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2000) Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* 28:713-726.
- Lindvall O, Kokaia Z, Martinez-Serrano A (2004) Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work. *Nat Med* 10 Suppl:S42-50.
- Liu HK, Belz T, Bock D, Takacs A, Wu H, Lichter P, Chai M, Schutz G (2008) The nuclear receptor tailless is required for neurogenesis in the adult subventricular zone. *Genes Dev* 22:2473-2478.

- Liu X, Bolteus AJ, Balkin DM, Henschel O, Bordey A (2006) GFAP-expressing cells in the postnatal subventricular zone display a unique glial phenotype intermediate between radial glia and astrocytes. *Glia* 54:394-410.
- Liu X, Wang Q, Haydar TF, Bordey A (2005) Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nat Neurosci* 8:1179-1187.
- Liu Z, Martin LJ (2003) Olfactory bulb core is a rich source of neural progenitor and stem cells in adult rodent and human. *J Comp Neurol* 459:368-391.
- Lledo PM, Alonso M, Grubb MS (2006) Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci* 7:179-193.
- Lois C, Alvarez-Buylla A (1993) Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2074-2077.
- Lois C, Alvarez-Buylla A (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264:1145-1148.
- Lopez-Juarez A, Howard J, Ullom K, Howard L, Grande A, Pardo A, Waclaw R, Sun YY, Yang D, Kuan CY, Campbell K, Nakafuku M (2013) Gsx2 controls region-specific activation of neural stem cells and injury-induced neurogenesis in the adult subventricular zone. *Genes Dev*.
- LoTurco JJ, Owens DF, Heath MJ, Davis MB, Kriegstein AR (1995) GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron* 15:1287-1298.
- Lugert S, Basak O, Knuckles P, Haussler U, Fabel K, Gotz M, Haas CA, Kempermann G, Taylor V, Giachino C (2010) Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging. *Cell Stem Cell* 6:445-456.
- Luo J, Daniels SB, Lenington JB, Notti RQ, Conover JC (2006) The aging neurogenic subventricular zone. *Aging Cell* 5:139-152.
- Ma DK, Kim WR, Ming GL, Song H (2009) Activity-dependent extrinsic regulation of adult olfactory bulb and hippocampal neurogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1170:664-673.
- Machold R, Hayashi S, Rutlin M, Muzumdar MD, Nery S, Corbin JG, Gritli-Linde A, Dellovade T, Porter JA, Rubin LL, Dudek H, McMahon AP, Fishell G (2003) Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron* 39:937-950.
- Manganas LN, Zhang X, Li Y, Hazel RD, Smith SD, Wagshul ME, Henn F, Benveniste H, Djuric PM, Enikolopov G, Maletic-Savatic M (2007) Magnetic resonance spectroscopy identifies neural progenitor cells in the live human brain. *Science* 318:980-985.
- Marin O, Rubenstein JL (2003) Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci* 26:441-483.
- Mathieu C, Sii-Felice K, Fouchet P, Etienne O, Haton C, Mabondzo A, Boussin FD, Mouthon MA (2008) Endothelial cell-derived bone morphogenetic proteins control proliferation of neural stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci* 38:569-577.
- Matsuzaki K, Katakura M, Hara T, Li G, Hashimoto M, Shido O (2009) Proliferation of neuronal progenitor cells and neuronal differentiation in the hypothalamus are enhanced in heat-acclimated rats. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 458:661-673.
- Mattson MP, Maudsley S, Martin B (2004) BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 27:589-594.
- McDonald HY, Wojtowicz JM (2005) Dynamics of neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats. *Neurosci Lett* 385:70-75.

- McGinn MJ, Sun D, Colello RJ (2008) Utilizing X-irradiation to selectively eliminate neural stem/progenitor cells from neurogenic regions of the mammalian brain. *Journal of neuroscience methods* 170:9-15.
- Melchior F, Hengst L (2002) SUMO-1 and p53. *Cell Cycle* 1:245-249.
- Mercier F, Kitasako JT, Hatton GI (2002) Anatomy of the brain neurogenic zones revisited: fractones and the fibroblast/macrophage network. *J Comp Neurol* 451:170-188.
- Mescher M, Merkle H, Kirsch J, Garwood M, Gruetter R (1998) Simultaneous in vivo spectral editing and water suppression. *NMR in biomedicine* 11:266-272.
- Messier B, Leblond CP, Smart I (1958) Presence of DNA synthesis and mitosis in the brain of young adult mice. *Exp Cell Res* 14:224-226.
- Migaud M, Batailler M, Segura S, Duittoz A, Franceschini I, Pilon D (2010) Emerging new sites for adult neurogenesis in the mammalian brain: a comparative study between the hypothalamus and the classical neurogenic zones. *Eur J Neurosci* 32:2042-2052.
- Milward EA, Lundberg CG, Ge B, Lipsitz D, Zhao M, Duncan ID (1997) Isolation and transplantation of multipotential populations of epidermal growth factor-responsive, neural progenitor cells from the canine brain. *Journal of neuroscience research* 50:862-871.
- Mira H, Andreu Z, Suh H, Lie DC, Jessberger S, Consiglio A, San Emeterio J, Hortiguera R, Marques-Torrejon MA, Nakashima K, Colak D, Gotz M, Farinas I, Gage FH (2010) Signaling through BMPR-IA regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* 7:78-89.
- Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2008) Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell* 3:265-278.
- Mizumatsu S, Monje ML, Morhardt DR, Rola R, Palmer TD, Fike JR (2003) Extreme sensitivity of adult neurogenesis to low doses of X-irradiation. *Cancer Res* 63:4021-4027.
- Molofsky AV, He S, Bydon M, Morrison SJ, Pardal R (2005) Bmi-1 promotes neural stem cell self-renewal and neural development but not mouse growth and survival by repressing the p16Ink4a and p19Arf senescence pathways. *Genes Dev* 19:1432-1437.
- Molofsky AV, Slutsky SG, Joseph NM, He S, Pardal R, Krishnamurthy J, Sharpless NE, Morrison SJ (2006) Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature* 443:448-452.
- Monje ML, Mizumatsu S, Fike JR, Palmer TD (2002) Irradiation induces neural precursor-cell dysfunction. *Nat Med* 8:955-962.
- Mori T, Wakabayashi T, Hirahara Y, Takamori Y, Koike T, Kurokawa K, Yamada H (2012) Differential responses of endogenous adult mouse neural precursors to excess neuronal excitation. *Eur J Neurosci* 36:3184-3193.
- Morshead CM, Garcia AD, Sofroniew MV, van Der Kooy D (2003) The ablation of glial fibrillary acidic protein-positive cells from the adult central nervous system results in the loss of forebrain neural stem cells but not retinal stem cells. *Eur J Neurosci* 18:76-84.
- Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA, Morassutti D, Weiss S, van der Kooy D (1994) Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 13:1071-1082.
- Morshead CM, van der Kooy D (1992) Postmitotic death is the fate of constitutively proliferating cells in the subependymal layer of the adult mouse brain. *J Neurosci* 12:249-256.

- Mouret A, Lledo PM, Coulombel L (2008) [Heterogeneous neuronal fate of subventricular zone neural stem cells in adults: a predestined mosaic of cell types]. *Medecine sciences : M/S* 24:9-11.
- Mudo G, Bonomo A, Di Liberto V, Frinchi M, Fuxe K, Belluardo N (2009) The FGF-2/FGFRs neurotrophic system promotes neurogenesis in the adult brain. *J Neural Transm* 116:995-1005.
- Nagai R, Tsunoda S, Hori Y, Asada H (2000) Selective vulnerability to radiation in the hippocampal dentate granule cells. *Surg Neurol* 53:503-506; discussion 506-507.
- Nam HS, Benezra R (2009) High levels of Id1 expression define B1 type adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* 5:515-526.
- Nam SC, Kim Y, Dryanovski D, Walker A, Goings G, Woolfrey K, Kang SS, Chu C, Chenn A, Erdelyi F, Szabo G, Hockberger P, Szele FG (2007) Dynamic features of postnatal subventricular zone cell motility: a two-photon time-lapse study. *J Comp Neurol* 505:190-208.
- Nguyen L, Malgrange B, Breuskin I, Bettendorff L, Moonen G, Belachew S, Rigo JM (2003) Autocrine/paracrine activation of the GABA(A) receptor inhibits the proliferation of neurogenic polysialylated neural cell adhesion molecule-positive (PSA-NCAM+) precursor cells from postnatal striatum. *J Neurosci* 23:3278-3294.
- Niola F, Zhao X, Singh D, Castano A, Sullivan R, Lauria M, Nam HS, Zhuang Y, Benezra R, Di Bernardo D, Iavarone A, Lasorella A (2012) Id proteins synchronize stemness and anchorage to the niche of neural stem cells. *Nat Cell Biol* 14:477-487.
- Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR (2001) Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409:714-720.
- O'Keeffe GC, Tyers P, Aarsland D, Dalley JW, Barker RA, Caldwell MA (2009) Dopamine-induced proliferation of adult neural precursor cells in the mammalian subventricular zone is mediated through EGF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:8754-8759.
- Olariu A, Cleaver KM, Cameron HA (2007) Decreased neurogenesis in aged rats results from loss of granule cell precursors without lengthening of the cell cycle. *J Comp Neurol* 501:659-667.
- Oldham MC, Konopka G, Iwamoto K, Langfelder P, Kato T, Horvath S, Geschwind DH (2008) Functional organization of the transcriptome in human brain. *Nat Neurosci* 11:1271-1282.
- Pagano SF, Impagnatiello F, Girelli M, Cova L, Grioni E, Onofri M, Cavallaro M, Eterri S, Vitello F, Giombini S, Solero CL, Parati EA (2000) Isolation and characterization of neural stem cells from the adult human olfactory bulb. *Stem Cells* 18:295-300.
- Palma V, Lim DA, Dahmane N, Sanchez P, Brionne TC, Herzberg CD, Gitton Y, Carleton A, Alvarez-Buylla A, Ruiz i Altaba A (2005) Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development* 132:335-344.
- Palma V, Ruiz i Altaba A (2004) Hedgehog-GLI signaling regulates the behavior of cells with stem cell properties in the developing neocortex. *Development* 131:337-345.
- Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, Singh B, Heelan R, Rusch V, Fulton L, Mardis E, Kupfer D, Wilson R, Kris M, Varmus H (2004) EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:13306-13311.
- Pastrana E, Cheng LC, Doetsch F (2009) Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:6387-6392.
- Pastrana E, Silva-Vargas V, Doetsch F (2011) Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell Stem Cell* 8:486-498.

- Pencea V, Bingaman KD, Freedman LJ, Luskin MB (2001a) Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain. *Exp Neurol* 172:1-16.
- Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ, Luskin MB (2001b) Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J Neurosci* 21:6706-6717.
- Pereira AC, Huddleston DE, Brickman AM, Sosunov AA, Hen R, McKhann GM, Sloan R, Gage FH, Brown TR, Small SA (2007) An in vivo correlate of exercise-induced neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:5638-5643.
- Petreau L, Alvarez-Buylla A (2002) Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J Neurosci* 22:6106-6113.
- Pineda JR, Daynac M, Chicheportiche A, Cebrian-Silla A, Sii Felice K, Garcia-Verdugo JM, Boussin FD, Mouthon MA (2013) Vascular-derived TGF-beta increases in the stem cell niche and perturbs neurogenesis during aging and following irradiation in the adult mouse brain. *EMBO molecular medicine*.
- Pinto L, Mader MT, Irmeler M, Gentilini M, Santoni F, Drechsel D, Blum R, Stahl R, Bulfone A, Malatesta P, Beckers J, Gotz M (2008) Prospective isolation of functionally distinct radial glial subtypes--lineage and transcriptome analysis. *Mol Cell Neurosci* 38:15-42.
- Platel JC, Boisseau S, Dupuis A, Brocard J, Poupard A, Savasta M, Villaz M, Albricieux M (2005) Na⁺ channel-mediated Ca²⁺ entry leads to glutamate secretion in mouse neocortical preplate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:19174-19179.
- Platel JC, Dave KA, Bordey A (2008a) Control of neuroblast production and migration by converging GABA and glutamate signals in the postnatal forebrain. *J Physiol* 586:3739-3743.
- Platel JC, Dave KA, Gordon V, Lacar B, Rubio ME, Bordey A (2010a) NMDA receptors activated by subventricular zone astrocytic glutamate are critical for neuroblast survival prior to entering a synaptic network. *Neuron* 65:859-872.
- Platel JC, Heintz T, Young S, Gordon V, Bordey A (2008b) Tonic activation of GLUK5 kainate receptors decreases neuroblast migration in whole-mounts of the subventricular zone. *J Physiol* 586:3783-3793.
- Platel JC, Lacar B, Bordey A (2007) GABA and glutamate signaling: homeostatic control of adult forebrain neurogenesis. *J Mol Histol* 38:303-311.
- Platel JC, Stambouliau S, Nguyen I, Bordey A (2010b) Neurotransmitter signaling in postnatal neurogenesis: The first leg. *Brain Res Rev* 63:60-71.
- Ponti G, Obernier K, Guinto C, Jose L, Bonfanti L, Alvarez-Buylla A (2013) Cell cycle and lineage progression of neural progenitors in the ventricular-subventricular zones of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:E1045-1054.
- Quinones-Hinojosa A, Sanai N, Soriano-Navarro M, Gonzalez-Perez O, Mirzadeh Z, Gil-Perotin S, Romero-Rodriguez R, Berger MS, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2006) Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *J Comp Neurol* 494:415-434.
- Raber J, Rola R, LeFevour A, Morhardt D, Curley J, Mizumatsu S, VandenBerg SR, Fike JR (2004) Radiation-induced cognitive impairments are associated with changes in indicators of hippocampal neurogenesis. *Radiat Res* 162:39-47.
- Rakic P (1985) Limits of neurogenesis in primates. *Science* 227:1054-1056.
- Rakic P (1988) Specification of cerebral cortical areas. *Science* 241:170-176.
- Rao MS, Hattiangady B, Abdel-Rahman A, Stanley DP, Shetty AK (2005) Newly born cells in the ageing dentate gyrus display normal migration, survival and neuronal fate choice but endure retarded early maturation. *Eur J Neurosci* 21:464-476.

- Raponi E, Agenes F, Delphin C, Assard N, Baudier J, Legraverend C, Deloulme JC (2007) S100B expression defines a state in which GFAP-expressing cells lose their neural stem cell potential and acquire a more mature developmental stage. *Glia* 55:165-177.
- Renault VM, Rafalski VA, Morgan AA, Salih DA, Brett JO, Webb AE, Villeda SA, Thekkat PU, Guillerey C, Denko NC, Palmer TD, Butte AJ, Brunet A (2009) FoxO3 regulates neural stem cell homeostasis. *Cell Stem Cell* 5:527-539.
- Reynolds BA, Weiss S (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255:1707-1710.
- Rietze RL, Valcanis H, Brooker GF, Thomas T, Voss AK, Bartlett PF (2001) Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain. *Nature* 412:736-739.
- Roccio M, Schmitter D, Knobloch M, Okawa Y, Sage D, Lutolf MP (2013) Predicting stem cell fate changes by differential cell cycle progression patterns. *Development* 140:459-470.
- Rocheffort C, Gheusi G, Vincent JD, Lledo PM (2002) Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *J Neurosci* 22:2679-2689.
- Rodriguez-Perez LM, Perez-Martin M, Jimenez AJ, Fernandez-Llebrez P (2003) Immunocytochemical characterisation of the wall of the bovine lateral ventricle. *Cell Tissue Res* 314:325-335.
- Rola R, Raber J, Rizk A, Otsuka S, VandenBerg SR, Morhardt DR, Fike JR (2004) Radiation-induced impairment of hippocampal neurogenesis is associated with cognitive deficits in young mice. *Exp Neurol* 188:316-330.
- Roman DD, Sperduto PW (1995) Neuropsychological effects of cranial radiation: current knowledge and future directions. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 31:983-998.
- Roque T, Haton C, Etienne O, Chicheportiche A, Rousseau L, Martin L, Mouthon MA, Boussin FD (2012) Lack of a p21waf1/cip -dependent G1/S checkpoint in neural stem and progenitor cells after DNA damage in vivo. *Stem Cells* 30:537-547.
- Sahay A, Hen R (2008) Hippocampal neurogenesis and depression. *Novartis Found Symp* 289:152-160; discussion 160-154, 193-155.
- Sakaue-Sawano A, Kurokawa H, Morimura T, Hanyu A, Hama H, Osawa H, Kashiwagi S, Fukami K, Miyata T, Miyoshi H, Imamura T, Ogawa M, Masai H, Miyawaki A (2008) Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell* 132:487-498.
- Sanai N, Berger MS, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2007) Comment on "Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension". *Science* 318:393; author reply 393.
- Sanai N, Nguyen T, Ihrie RA, Mirzadeh Z, Tsai HH, Wong M, Gupta N, Berger MS, Huang E, Garcia-Verdugo JM, Rowitch DH, Alvarez-Buylla A (2011) Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature* 478:382-386.
- Sanai N, Tramontin AD, Quinones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S, Lawton MT, McDermott MW, Parsa AT, Manuel-Garcia Verdugo J, Berger MS, Alvarez-Buylla A (2004) Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 427:740-744.
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R (2003) Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301:805-809.
- Sawamoto K, Wichterle H, Gonzalez-Perez O, Cholfin JA, Yamada M, Spassky N, Murcia NS, Garcia-Verdugo JM, Marin O, Rubenstein JL, Tessier-Lavigne M, Okano H, Alvarez-Buylla A (2006) New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science* 311:629-632.

- Saxe MD, Battaglia F, Wang JW, Malleret G, David DJ, Monckton JE, Garcia AD, Sofroniew MV, Kandel ER, Santarelli L, Hen R, Drew MR (2006) Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:17501-17506.
- Seoane J (2009) TGFbeta and cancer initiating cells. *Cell Cycle* 8:3787-3788.
- Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A (2001) Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* 21:7153-7160.
- Shen Q, Wang Y, Kokovay E, Lin G, Chuang SM, Goderie SK, Roysam B, Temple S (2008) Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell* 3:289-300.
- Shi Y, Chichung Lie D, Taupin P, Nakashima K, Ray J, Yu RT, Gage FH, Evans RM (2004) Expression and function of orphan nuclear receptor TLX in adult neural stem cells. *Nature* 427:78-83.
- Shingo T, Gregg C, Enwere E, Fujikawa H, Hassam R, Geary C, Cross JC, Weiss S (2003) Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science* 299:117-120.
- Shinohara C, Gobbel GT, Lamborn KR, Tada E, Fike JR (1997) Apoptosis in the subependyma of young adult rats after single and fractionated doses of X-rays. *Cancer Res* 57:2694-2702.
- Sidman RL, Rakic P (1973) Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. *Brain Res* 62:1-35.
- Sii-Felice K, Etienne O, Hoffschir F, Mathieu C, Riou L, Barroca V, Haton C, Arwert F, Fouchet P, Boussin FD, Mouthon MA (2008) Fanconi DNA repair pathway is required for survival and long-term maintenance of neural progenitors. *EMBO J* 27:770-781.
- Smart IH (1973) Proliferative characteristics of the ependymal layer during the early development of the mouse neocortex: a pilot study based on recording the number, location and plane of cleavage of mitotic figures. *J Anat* 116:67-91.
- Snapyan M, Lemasson M, Brill MS, Blais M, Massouh M, Ninkovic J, Gravel C, Berthod F, Gotz M, Barker PA, Parent A, Saghatelian A (2009) Vasculature guides migrating neuronal precursors in the adult mammalian forebrain via brain-derived neurotrophic factor signaling. *J Neurosci* 29:4172-4188.
- Snyder JS, Choe JS, Clifford MA, Jeurling SI, Hurley P, Brown A, Kamhi JF, Cameron HA (2009) Adult-born hippocampal neurons are more numerous, faster maturing, and more involved in behavior in rats than in mice. *J Neurosci* 29:14484-14495.
- Soderstrom S, Bengtsson H, Ebendal T (1996) Expression of serine/threonine kinase receptors including the bone morphogenetic factor type II receptor in the developing and adult rat brain. *Cell Tissue Res* 286:269-279.
- Sommer B, Seeburg PH (1992) Glutamate receptor channels: novel properties and new clones. *Trends Pharmacol Sci* 13:291-296.
- Song J, Zhong C, Bonaguidi MA, Sun GJ, Hsu D, Gu Y, Meletis K, Huang ZJ, Ge S, Enikolopov G, Deisseroth K, Luscher B, Christian KM, Ming GL, Song H (2012) Neuronal circuitry mechanism regulating adult quiescent neural stem-cell fate decision. *Nature*.
- Song K, Wang H, Krebs TL, Danielpour D (2006) Novel roles of Akt and mTOR in suppressing TGF-beta/ALK5-mediated Smad3 activation. *EMBO J* 25:58-69.
- Spalding KL, Bergmann O, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Huttner HB, Bostrom E, Westerlund I, Vial C, Buchholz BA, Possnert G, Mash DC, Druid H, Frisen J (2013) Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell* 153:1219-1227.

- Spassky N, Merkle FT, Flames N, Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2005) Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J Neurosci* 25:10-18.
- Squire LR (1992) Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev* 99:195-231.
- Stoll EA, Habibi BA, Mikheev AM, Lasiene J, Massey SC, Swanson KR, Rostomily RC, Horner PJ (2011) Increased re-entry into cell cycle mitigates age-related neurogenic decline in the murine subventricular zone. *Stem Cells* 29:2005-2017.
- Stylopoulos LA, George AE, de Leon MJ, Miller JD, Foo SH, Hiesiger E, Wise A (1988) Longitudinal CT study of parenchymal brain changes in glioma survivors. *AJNR Am J Neuroradiol* 9:517-522.
- Sun G, Yu RT, Evans RM, Shi Y (2007) Orphan nuclear receptor TLX recruits histone deacetylases to repress transcription and regulate neural stem cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:15282-15287.
- Tada E, Parent JM, Lowenstein DH, Fike JR (2000) X-irradiation causes a prolonged reduction in cell proliferation in the dentate gyrus of adult rats. *Neuroscience* 99:33-41.
- Tada E, Yang C, Gobbel GT, Lamborn KR, Fike JR (1999) Long-term impairment of subependymal repopulation following damage by ionizing irradiation. *Exp Neurol* 160:66-77.
- Talos F, Abraham A, Vaseva AV, Holembowski L, Tsirka SE, Scheel A, Bode D, Döbelstein M, Brück W, Moll UM (2010) p73 is an essential regulator of neural stem cell maintenance in embryonal and adult CNS neurogenesis. *Cell Death Differ* 17:1816-1829.
- Tanapat P, Hastings NB, Reeves AJ, Gould E (1999) Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neurosci* 19:5792-5801.
- Tavazoie M, Van der Veken L, Silva-Vargas V, Louissaint M, Colonna L, Zaidi B, Garcia-Verdugo JM, Doetsch F (2008) A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* 3:279-288.
- Tofilon PJ, Fike JR (2000) The radioresponse of the central nervous system: a dynamic process. *Radiat Res* 153:357-370.
- Toni N, Teng EM, Bushong EA, Aimone JB, Zhao C, Consiglio A, van Praag H, Martone ME, Ellisman MH, Gage FH (2007) Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nat Neurosci* 10:727-734.
- Tropepe V, Craig CG, Morshead CM, van der Kooy D (1997) Transforming growth factor- α null and senescent mice show decreased neural progenitor cell proliferation in the forebrain subependyma. *J Neurosci* 17:7850-7859.
- Valenzuela DM, Economides AN, Rojas E, Lamb TM, Nunez L, Jones P, Lippman NY, Espinosa R, 3rd, Brannan CI, Gilbert DJ, et al. (1995) Identification of mammalian noggin and its expression in the adult nervous system. *J Neurosci* 15:6077-6084.
- Valley MT, Mullen TR, Schultz LC, Sagdullaev BT, Firestein S (2009) Ablation of mouse adult neurogenesis alters olfactory bulb structure and olfactory fear conditioning. *Frontiers in neuroscience* 3:51.
- van den Berge SA, Middeldorp J, Zhang CE, Curtis MA, Leonard BW, Mastroeni D, Voorn P, van de Berg WD, Huitinga I, Hol EM (2010) Longterm quiescent cells in the aged human subventricular neurogenic system specifically express GFAP- Δ . *Aging Cell* 9:313-326.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH (2000) Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci* 1:191-198.

- Wachs FP, Winner B, Couillard-Despres S, Schiller T, Aigner R, Winkler J, Bogdahn U, Aigner L (2006) Transforming growth factor-beta1 is a negative modulator of adult neurogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:358-370.
- Wang C, Liu F, Liu YY, Zhao CH, You Y, Wang L, Zhang J, Wei B, Ma T, Zhang Q, Zhang Y, Chen R, Song H, Yang Z (2011) Identification and characterization of neuroblasts in the subventricular zone and rostral migratory stream of the adult human brain. *Cell research* 21:1534-1550.
- Wang DD, Krueger DD, Bordey A (2003) GABA depolarizes neuronal progenitors of the postnatal subventricular zone via GABAA receptor activation. *J Physiol* 550:785-800.
- Wang L, Martin DR, Baker HJ, Zinn KR, Kappes JC, Ding H, Gentry AS, Harper S, Snyder EY, Cox NR (2007) Neural progenitor cell transplantation and imaging in a large animal model. *Neurosci Res* 59:327-340.
- Weickert CS, Webster MJ, Colvin SM, Herman MM, Hyde TM, Weinberger DR, Kleinman JE (2000) Localization of epidermal growth factor receptors and putative neuroblasts in human subependymal zone. *J Comp Neurol* 423:359-372.
- Weigmann A, Corbeil D, Hellwig A, Huttner WB (1997) Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12425-12430.
- Weiss S, Reynolds BA, Vescovi AL, Morshead C, Craig CG, van der Kooy D (1996) Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain? *Trends Neurosci* 19:387-393.
- Weissman T, Noctor SC, Clinton BK, Honig LS, Kriegstein AR (2003) Neurogenic radial glial cells in reptile, rodent and human: from mitosis to migration. *Cerebral cortex* 13:550-559.
- Werry EL, Enjeti S, Halliday GM, Sachdev PS, Double KL (2010) Effect of age on proliferation-regulating factors in human adult neurogenic regions. *J Neurochem* 115:956-964.
- Whitman MC, Greer CA (2007) Adult-generated neurons exhibit diverse developmental fates. *Dev Neurobiol* 67:1079-1093.
- Whitman MC, Greer CA (2009) Adult neurogenesis and the olfactory system. *Prog Neurobiol* 89:162-175.
- Winner B, Cooper-Kuhn CM, Aigner R, Winkler J, Kuhn HG (2002) Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 16:1681-1689.
- Wojtowicz JM (2006) Irradiation as an experimental tool in studies of adult neurogenesis. *Hippocampus* 16:261-266.
- Yang P, Arnold SA, Habas A, Hetman M, Hagg T (2008) Ciliary neurotrophic factor mediates dopamine D2 receptor-induced CNS neurogenesis in adult mice. *J Neurosci* 28:2231-2241.
- Yingling JM, Blanchard KL, Sawyer JS (2004) Development of TGF-beta signalling inhibitors for cancer therapy. *Nature reviews Drug discovery* 3:1011-1022.
- Yoshihara S, Omichi K, Yanazawa M, Kitamura K, Yoshihara Y (2005) Arx homeobox gene is essential for development of mouse olfactory system. *Development* 132:751-762.
- Zecevic N, Chen Y, Filipovic R (2005) Contributions of cortical subventricular zone to the development of the human cerebral cortex. *J Comp Neurol* 491:109-122.
- Zhang CL, Zou Y, He W, Gage FH, Evans RM (2008) A role for adult TLX-positive neural stem cells in learning and behaviour. *Nature* 451:1004-1007.
- Zhang RL, Zhang ZG, Zhang L, Chopp M (2001) Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 105:33-41.

- Zhao C, Deng W, Gage FH (2008) Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132:645-660.
- Zhao C, Teng EM, Summers RG, Jr., Ming GL, Gage FH (2006) Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci* 26:3-11.
- Ziegler AN, Schneider JS, Qin M, Tyler WA, Pintar JE, Fraidenraich D, Wood TL, Levison SW (2012) IGF-II promotes stemness of neural restricted precursors. *Stem Cells* 30:1265-1276.

RESUME

Les cellules souches neurales quiescentes (CSN) sont le réservoir de la neurogenèse adulte, permettant de produire des nouveaux neurones tout au long de la vie. Cependant, la neurogenèse décroît au cours du vieillissement, provoquant des déclinis cognitifs incurables. Afin de mieux comprendre les mécanismes qui contrôlent la prolifération des CSN, nous avons mis en place une méthode de tri par cytométrie en flux qui permet pour la première fois d'isoler les CSN quiescentes et leurs cellules filles dans la ZSV adulte murine. Cette technique nous a permis de prouver que le blocage de la voie GABA_AR *in vivo* provoque l'entrée en cycle des CSN quiescentes. Ainsi, les signaux GABA produits par les neuroblastes dans la ZSV permettent de maintenir les CSN dans leur état de quiescence. Au cours du vieillissement, nous montrons que la production progressive de TGFβ1 par les cellules endothéliales de la niche allonge la phase G1 des CSN activées, diminuant sensiblement la production de nouveaux neurones, sans toutefois diminuer le stock de CSN. Nous mettons ainsi en évidence deux voies majeures contrôlant la prolifération des CSN *in vivo*, la voie du GABA_AR et la voie TGF-β/Smad-3. En vue d'une application thérapeutique, nous prouvons que leur blocage pharmacologique permet de stimuler efficacement la neurogenèse *in vivo*.

Quiescent neural stem cells (NSCs) are considered the reservoir for adult neurogenesis, generating new neurons throughout life. However, neurogenesis decreases during aging, causing a progressive decline that is currently untreatable. To study the regulatory mechanisms of NSCs proliferation, we set up a new technique allowing the isolation of quiescent NSCs and their progeny. We show that GABA_AR directly regulates NSCs quiescence *in vivo* as the depletion of GABA-producing neuroblasts or GABA_AR pathway pharmacological blockade provoked NSCs cell cycle entry in the SVZ. During aging, the stock of NSCs is not perturbed, but we show that an over-production of TGFβ1 by brain endothelial cells directly lengthens activated NSCs G1 phase, strongly decreasing the production of new neurons. These findings highlight GABA_AR and TGF-β/Smad-3 as two major pathways controlling NSCs proliferation. In line with a future therapeutic application, we also prove that their blocking stimulates endogenous neurogenesis *in vivo*.